

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2000-516445

(P2000-516445A)

(43) 公表日 平成12年12月12日(2000.12.12)

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	ページコード (参考)
C 1 2 N 15/09	Z N A	C 1 2 N 15/00	Z N A A
A 6 1 K 38/00		A 6 1 K 39/21	
39/21		A 6 1 P 37/04	
A 6 1 P 37/04		C 0 7 K 14/155	
C 0 7 K 14/155		C 1 2 P 21/02	C
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全130頁) 最終頁に続く			

(21) 出願番号 特願平10-503257  
 (86) (22) 出願日 平成9年6月17日(1997.6.17)  
 (85) 翻訳文提出日 平成10年12月18日(1998.12.18)  
 (86) 国際出願番号 P C T / U S 9 7 / 1 0 5 1 7  
 (87) 国際公開番号 W O 9 7 / 4 8 3 7 0  
 (87) 国際公開日 平成9年12月24日(1997.12.24)  
 (31) 優先権主張番号 6 0 / 0 2 0 , 1 6 5  
 (32) 優先日 平成8年6月21日(1996.6.21)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)  
 (31) 優先権主張番号 6 0 / 0 2 0 , 1 6 6  
 (32) 優先日 平成8年6月21日(1996.6.21)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 メルク エンド カンパニー インコーポ  
 レーテッド  
 アメリカ合衆国、ニュージャージー  
 07065、ローウエイ、イースト リンカー  
 ン アヴェニュー 128  
 (72) 発明者 シバー、ジョン・ダブリュ  
 アメリカ合衆国、ニュー・ジャージー・  
 07065、ローウエイ、イースト・リンカー  
 ン・アヴェニュー・128  
 (74) 代理人 弁理士 川口 義雄 (外2名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 合成遺伝子を含むワクチン

(57) 【要約】

ペプチド又はタンパク質をコードするDNA配列を含む合成ポリヌクレオチドが提供される。この合成ポリヌクレオチドのDNA配列は、非同種宿主における発現に最適化されたコドンを含む。本発明は、H I V e n v はもちろん、H I V e n v の改変をコードする合成DNA分子によって例示される。この合成分子のコドンは計画された宿主細胞が好むコドンを含む。この合成分子は外来遺伝物質の好ましい形態を提供する。この合成分子は、中和抗体及び細胞媒介免疫によりH I V 感染に対する免疫学的予防をもたらすポリヌクレオチドワクチンとして用いることができる。本発明は、霊長類及びヒトのような哺乳動物を含むイン・ビオ育種動物に直接導入された場合に、コードされたタンパク質の発現をその動物体内で誘発するポリヌクレオチドを提供する。

## 【特許請求の範囲】

1. ペプチド又はタンパク質をコードするDNA配列を含み、該DNA配列が非哺乳宿主における発現に最適化されたコドンを含む合成ポリヌクレオチド。

2. 前記タンパク質がHIVタンパク質である請求項1記載の合成ポリヌクレオチド。

3. 前記DNA配列がHIV envタンパク質又はそれらの断片をコードし、該DNA配列が哺乳動物宿主における発現に最適化されたコドンを含む請求項1記載の合成ポリヌクレオチド。

4. V1Jns-tPA-HTVw gpl20;  
 V1Jns-tPA-HIVw gpl20;  
 V1Jns-tPA-gpl40/mutRRE-A/SRV-1 3'  
 -UTR;  
 V1Jns-tPA-gpl40/mutRRE-B/SRV-1 3'  
 -UTR;  
 V1Jns-tPA-gpl40/opt30-A;  
 V1Jns-tPA-gpl40/opt30-B;

V1Jns-tPA-gpl40/opt all-A;  
 V1Jns-tPA-gpl40/opt all-B;  
 V1Jns-tPA-gpl40/opt all-A;  
 V1Jns-tPA-gpl40/opt all-B;  
 V1Jns-rev/env;;  
 V1Jns-gpl60;  
 V1Jns-tPA-gpl60;  
 V1Jns-tPA-gpl60/optC1/opt41-A;  
 V1Jns-tPA-gpl60/optC1/opt41-B;  
 V1Jns-tPA-gpl60/opt all-A;  
 V1Jns-tPA-gpl60/opt all-B;

V I J n s - t P A - g p l 6 0 / o p t a l l - A ;  
 V I J n s - t P A - g p l 6 0 / o p t a l l - B ;  
 V I J n s - t P A - g p l 4 3 ;  
 V I J n s - t P A - g p l 4 3 / m u t R R E - A ;  
 V I J n s - t P A - g p l 4 3 / m u t R R E - B ;  
 V I J n s - t P A - g p l 4 3 / o p t 3 2 - A ;  
 V I J n s - t P A - g p l 4 3 / o p t 3 2 - B ;  
 V I J n s - t P A - g p l 4 3 / S R V - 1 3 ' - U T R ;  
 V I J n s - t P A - g p l 4 3 / o p t C 1 / o p t 3 2 A ;  
 V I J n s - t P A - g p l 4 3 / o p t C 1 / o p t 3 2 B ;  
 V I J n s - t P A - g p l 4 3 / o p t a l l - A ;  
 V I J n s - t P A - g p l 4 3 / o p t a l l - B ;

V I J n s - t P A - g p l 4 3 / o p t a l l - A ;  
 V I J n s - t P A - g p l 4 3 / o p t a l l - B ;  
 V I J n s - t P A - g p l 4 3 / o p t 3 2 - A / g l y B ;  
 V I J n s - t P A - g p l 4 3 / o p t 3 2 - B / g l y B ;  
 V I J n s - t P A - g p l 4 3 / o p t C 1 / o p t 3 2 - A / g l y

B ;

V I J n s - t P A - g p l 4 3 / o p t C 1 / o p t 3 2 - B / g l y

B ;

V I J n s - t P A - g p l 4 3 / o p t a l l - A / g l y B ;  
 V I J n s - t P A - g p l 4 3 / o p t a l l - B / g l y B ;  
 V I J n s - t P A - g p l 4 3 / o p t a l l - A / g l y B ;  
 V I J n s - t P A - g p l 4 3 / o p t a l l - B

/ g l y B ; 及びそれらの組み合わせから選択される請求項3記載のポリペプチド。

5. ヒト組織を含むイン・ビボ脊椎動物組織に導入した際に抗-HIV中和抗

体、HIV特異的T細胞免疫応答、又は防御免疫応答を誘発し、該ポリヌクレオチドがHIV gag、HIVプロテアーゼ及びそれらの組み合わせをコードする遺伝子を含む請求項2記載のポリヌクレオチド。

6. 脊椎動物においてHIVエボトープに対する免疫応答を誘発するための方法であって、脊椎動物の組織に1ngないし100mgの請求項2記載のポリヌクレオチドを導入することを包含する方法。

7. rev非依存性HIV遺伝子をイン・ビボで免疫応答を誘発するのに用いるための方法であって、

a) rev非依存性HIV遺伝子を合成し；

b) 該合成された遺伝子を、該遺伝子が制御配列に作動的に連結されていることによって発現可能であるように調節配列に連結し、ここで該制御配列は、生きている組織に導入された場合、該遺伝子の転写開始及び引き続く翻訳を導く、ことを包含する方法。

8. HIVの毒性株によって引き起こされる感染又は疾患に対して免疫応答を誘発するための方法であって、脊椎動物の組織に請求項2記載のポリヌクレオチドを導入することを包含する方法。

9. HIV感染に対する免疫応答を誘発するためのワクチンであって、請求項2記載のポリヌクレオチド及び薬学的に許容し得る担体を含むワクチン。

10. 霊長類において抗-HIV免疫応答を誘発するための方法であって、霊長類の組織に請求項2記載のポリヌクレオチドを導入し、かつ同時に、インターロイキン12、GM-CSF、又はそれらの組み合わせを非経口投与することを包含する方法。

11. 抗原提示細胞を誘発して細胞毒性及びヘルパーT細胞の増殖並びにHIV抗原に特異的なリンホカインの分泌を含むエフェクター機能を刺激する方法であって、脊椎動物の細胞をイン・ビボで請求項2記載のポリヌクレオチドに曝すことを包含する方法。

12. HIV env又はそれらの断片をコードするDNAのrev非依存性イン・ビボ発現を増大させる方法であって、

(a) 適切なオープンリーディングフレームのコードンの配置を特定し；

(b) 野生型のコードンを、観察されたヒト遺伝子による使用頻度について比較し；

(c) 野生型コードンを、ヒト遺伝子の高い発現に最適化されたコードンで置換し；及び

(d) 改善された発現について試験する、  
ことを包含する方法。

13. 請求項2記載のポリヌクレオチドを含む、HIV感染に対する免疫応答を誘発するためのワクチンであって、該ポリヌクレオチドがカナリボックス、ワクチニアウイルス、アデノウイルス、アデノ関連ウイルス、レトロウイルス、リステリア、赤痢菌、特異的リガンド、BCG、又はサルモネラ菌によって送達されるワクチン。

14. HIVに対する免疫応答を誘発する方法であって、請求項2記載のポリヌクレオチドの投与及び弱毒化HIV、殺したHIV、HIVタンパク質、HIVタンパク質の断片、又はそれらの組み合わせの投与を包含し、該ポリヌクレオチドの投与が弱毒化HIV、殺したHIV、HIVタンパク質、HIV

タンパク質の断片、又はそれらの組み合わせの投与の前、又はそれと同時、又はそれに続く方法。

15. HIVに対する免疫応答を誘発する方法であって、請求項2記載のポリヌクレオチドをアジュバントと共に投与することを包含する方法。

16. HIV感染の治療方法であって、請求項2記載のポリヌクレオチドを患者に投与し、かつ抗-HIV化合物を患者に投与することを包含し、該ポリヌクレオチドの投与が該抗-HIV化合物の投与の前、又はそれと同時、又はそれに続く方法。

17. 非同種宿主における遺伝子の発現を増大させる方法であって、

a) 野生型遺伝子のコードンを非同種宿主が好むコードンと比較し；

b) 野生型遺伝子のコードンを、非同種宿主が好むDNA配列を有する新たなコードンで置換し；

c) 新たなコドンの第3ヌクレオチド及び該第1のコドンのすぐ3'側に隣接する新たなコドンの第1ヌクレオチドを検査し、新たなコドンの選択により5'-CG-3'対形成が側出されている場合にはそれを置換し；

d) 望ましくない配列を除去して合成最適化遺伝子を得；及び

e) 該合成遺伝子を非同種宿主に挿入する、

ことを包含する方法。

18. 宿主においてペプチドを発現させる方法であって、請求項1記載の合成ポリヌクレオチドを該宿主に投与することを包含する方法。

19. 宿主による組換えタンパク質の産生を増大させる方法であって、

a) 宿主細胞を請求項1記載の合成ポリヌクレオチドで形質転換して形質転換宿主を産生し；及び

b) 該形質転換宿主を該合成ポリヌクレオチドの発現及び該組換えタンパク質の産生を許容する条件下で培養する、

ことを包含する方法。

## 【発明の詳細な説明】

合成遺伝子を含むワクチン発明の背景1. HIV感染：

ヒト免疫不全ウイルス-1 (HIV-1) は後天性ヒト免疫不全症候群 (AIDS) 及び関連疾患の病因学的作用因子である。HIV-1 はレトロウイルス科のRNAウイルスであり、全てのレトロウイルスの5' LTR-gag-pol-env-LTR3' 構成を示す。加えて、HIV-1 は、tat 及び rev 遺伝子を含む、調節もしくは未知の機能を有する多少の遺伝子を含む。env 遺伝子はウイルスエンベロープ糖タンパク質をコードし、これは160キログルトン (kDa) の前駆体 (gp160) として翻訳された後、細胞性プロテアーゼによる開裂を受けて外部120kDaエンベロープ糖タンパク質 (gp120) 及び膜貫通41kDaエンベロープ糖タンパク質 (gp41) を生じる。gp120 及び gp41 は会合したままであり、ウイルス粒子及びHIV感染細胞表面上に現れる。gp120 はヘルパーTリンパ球、マクロファージ及び他の標

的細胞上に存在するCD4受容体に結合する。gp120 がCD4に結合した後、gp41 はウイルス侵入の原因である融合現象に媒介する。

ウイルス粒子上のgp120 がT4リンパ球又は他の標的細胞の表面上のCD4受容体に結合したときに感染が始まる。結合したウイルスは標的細胞と合体し、そのRNAゲノムを細胞の二本鎖DNAに逆転写する。ウイルスDNAが細胞の核の遺伝物質に組み込まれ、そこでこのウイルスDNAが新たなウイルスRNA、ウイルスタンパク質、及び新たなウイルス粒子の産生を導く。新たな粒子は標的細胞の膜から発芽し、他の細胞に感染する。

免疫防御に重要であるT4リンパ球の破壊は、HIV感染の特徴である進行性免疫機能障害の主因である。標的細胞の喪失はほとんどの侵入体に抗する身体の能力を大きく損なうが、ウイルス、真菌、寄生虫及びミコプラズマを含む特定の細菌に対する防御に特に深刻な打撃を加える。

HIV-1 は、感染した細胞を、複製し、それから発芽し、かつ細胞膜に損

傷を与えることにより殺す。HIV-1は、感染した細胞の表面に現れるウイルス gp120により標的細胞

を間接的に殺すことがあろう。T細胞上のCD4受容体がgp120に対する強い親和性を有するため、CD4受容体を発現する健康細胞がgp120に結合し、感染細胞と融合して融合細胞を形成することがある。融合細胞は生存することができない。

また、HIV-1は感染細胞に対する正常な細胞性免疫防御を誘発することもある。抗体の助力で、またはそれ無しに、細胞毒性防御細胞はその表面上にウイルスタンパク質を示す感染細胞を破壊することができる。最終的に、遊離のgp120がHIV-1に感染した個体の血液中を循環し得る。この遊離のタンパク質は未感染細胞のCD4受容体に結合し、それらを感染したように見せて免疫応答を誘発することが可能である。

HIV-1での感染はほとんど常に致死的なものであり、現時点ではHIV-1感染に対する治療は存在しない。HIV-1感染を予防する上で有効なワクチンはいまだに得られていない。復帰突然変異又は感染の危険性のため、生弱毒化ワクチンはおそらくワクチンとして用いることができない。大部分のサブユニットワクチンのアプローチはHIV感染の予防では成功していない。HIV-1感染の治療は、何人かでの感染者を延

命させるものの、深刻な副作用を有する。したがって、この致死性感染との格闘に有効な治療及びワクチンに対する大きな必要性が存在する。

## 2. ワクチン

ワクチン接種は疾患予防の有効な形態であり、いくつかの型のウイルス感染に対して成功することが立証されている。防御体液性及び細胞性免疫を誘発するためにヒト免疫系にHIV-1抗原を提示する方法の決定は困難な作業である。今日まで、有効なHIVワクチンを生成しようとする試みは成功していない。AIDS患者においては、遊離のウイルスは低濃度でのみ存在する。HIV-1の伝染は、細胞-細胞相互作用により融合及び融合細胞形成を介して高まる。したが



って、遊離のウイルス又はウイルスサブユニットに対して産生する抗体は、ウイルス感染細胞の排除の点では一般に無力である。

ワクチンは、抗原を“覚える”身体的能力を利用する。所定の抗原との最初の遭遇の後、免疫系はその抗原の免疫学的記憶を個体の一生の間保持する細胞を産生する。引き続いてその抗原に晒すと、免疫応答が刺激され、その病原体の排除又は不活性化が生じる。

免疫系は病原体を2通りの方法：体液性応答及び細胞媒介応答により処理する。体液性応答においては、リンパ球が、抗原に結合し、それによりその病原体を不活性化する特異的抗体を産生する。細胞媒介応答は、感染細胞を特異的に攻撃して破壊する細胞毒性ヘルパーTリンパ球を含む。

HIV-1ウイルスを用いるワクチンの開発には、そのワクチンが免疫系において活性化することが必要な細胞と同じ細胞（すなわち、T4リンパ球）の幾つかにHIV-1が感染する問題がある。免疫系の損傷が生じる前にHIVを不活性化するワクチンを開発することが有利である。特に適する型のHIVワクチンは、HIV変種を認識し、かつ感染の開始期のHIV陽性個体において作用する抗-HIV免疫応答を生成する。

中和及び防御免疫応答を誘発することが望まれる、ウイルス、特にヒト免疫不全ウイルスのような高率で突然変異を生じるものに対するワクチンを開発する上での主な問題は、異なるウイルス単離体又は株の間でのウイルスエンベロップタンパク質の多様性である。マウス及びヒトの両者における細胞毒性Tリンパ球（CTL）は保存された内部ウイルスタンパク質から誘導されるエピトープを認識することが可能であり、ウイルスに

対する免疫応答において重要であるものと考えられるため、異なるウイルス株に対する異種防御を提供することが可能なCTLワクチンの開発に努力が注がれている。

CD8<sup>+</sup>CTLは、それらのT細胞受容体がMHCクラスI分子と会合したウイルスペプチドを認識したときにウイルス感染細胞を殺すことが知られている。

このウイルスペプチドは、内生的に合成されたウイルスタンパク質から、そのタンパク質の位置又はウイルス内での機能とは無関係に誘導される。したがって、保存されたウイルスタンパク質に由来するエピトープを認識することにより、CTLは交差株防御をもたらすことが可能である。MHCクラスIと会合することが可能なCTL認識のためのペプチドは、細胞質もしくは小胞体内に存在し、又はそれを通過するタンパク質に由来する。一般には、(MHCクラスI分子によって提示される抗原の場合のように) エンドソーム処理経路に入る外来性タンパク質はCD8<sup>+</sup>CTL応答の生成に有効ではない。

CTL応答を生成しようとする労力の大部分では細胞内でのタンパク質抗原の産生に複製ベクターが用いられるか、又は細胞質ゾルへのペプチドの導入に焦点が当てられている。これら

のアプローチには、それらのワクチンとしての有用性が低下し得るという制限がある。レトロウイルスベクターには、その複製ウイルスの複製する能力を一方では維持しながら、融合タンパク質として発現し得るポリペプチドのサイズ及び構造に制限があり、そして、引き続く免疫のためのワクチニアのようなベクターの有効性はそれらのベクター自体に対する免疫応答により弱体化されよう。また、ウイルスベクター及び改変病原体にはヒトにおけるそれらの使用を妨げ得る固有の危険性がある。さらに、提示させようとするペプチドエピトープの選択は個体のMHC抗原の構造に依存し、したがって、ペプチドワクチンには、異種交配集団におけるMHCハプロタイプの多様性のために有効性に限界がある可能性がある。

### 3. DNAワクチン

Benvenisty, N. 及び Reshef, L. [PNAS 83, 9551-9555, (1986年)] は、マウスに腹腔内(i. p.)、静脈内(i. v.) 又は筋肉内(i. m.) により導入されたCaPO<sub>4</sub>沈殿DNAが発現可能であることを示した。CaCl<sub>2</sub>処理無しでマウスにDNA発現ベクターをi. m. 注射することにより、筋肉細胞によるDNA

の取り込み及びそのDNAによってコードされるタンパク質の発現が生じた。このプラスミドはエピソーム的に維持され、複製しなかった。続いて、ラット、魚類及び霊長類の付格筋、並びにラットの心筋へのi.m.注射の後に持続性の発現が観察されている。核酸を治療薬として用いるこの技術はWO90/11092号(1990年10月4日)に報告されており、この報告では裸のポリヌクレオチドが脊椎動物のワクチン接種に用いられた。

免疫が筋肉内であることはこの方法の成功に必要なことではない。ウシ成長ホルモン(BGH)をコードするDNAをコートした金微小弾丸をマウスの皮膚に導入することにより、そのマウスで抗-BGH抗体が産生した。生きている動物の皮膚、筋肉、脂肪及び乳組織の形質移入にはジェットインジェクター(jet injector)が用いられている。核酸を導入するための様々な方法が再検討されている。マウスにおけるDNA:カチオン性リポソーム複合体の静脈内注射によりクローン化導入遺伝子の全身性発現を生じることばZhuら[Science 261:209-211(1993年7月9日)]によって示された。Ulmerら[Science 259:

1745-1749(1993年)]は、インフルエンザウイルスタンパク質をコードするDNAの筋肉内注射によるインフルエンザウイルスの感染に対する異種防御に関して報告した。

病原体及び腫瘍抗原に対する所望の免疫応答を誘発することが可能な特定の治療及び予防薬に対する必要性が、本発明によって満たされる。この治療アプローチにおいて特に重要な点は、抗原遺伝子が得られた株とは異種のウイルス株によって引き起こされた感染又は疾患であっても、それを予防することが可能なT細胞免疫応答を誘発する能力である。これはHIVを扱う場合に特に関心のあるものであり、何故ならばこのウイルスは急速に突然変異するものと認識されており、かつ多くの毒性単離体が同定されているためである(例えば、245の別々のHIV単離体を同定しているLaRosaら, Science 249:932-935(1990年)を参照)。この認識された多様性に対応して、研究者らはベブド免疫に基づくCTLの生成を試みている。このようにして、Taka

hashira [Science 255:333-336 (1992年)] は、  
HIVエンベロープ (gp160) 決定基を認識する広範囲に交差反応性の細胞  
毒性T細胞の誘発について報告した。し

かしながら、これらの研究者らは真の交差反応性CTL応答を達成することが困  
難であることを認識し、T細胞の非常に厳格な初回刺激又は再刺激と既に刺激さ  
れているCTLからの細胞毒性を含むエフェクター機能の誘発とは対立している  
ことを示唆した。

Wangらは、クローン化ゲノム(非スプライス化) HIV遺伝子を筋肉内接  
種することによる、マウスにおけるHIVに対する免疫応答の誘発に関して報告  
した。しかしながら、これらの研究において達成された免疫応答の水準は非常に  
低かった。加えて、WangらのDNA構築体では連続するTat/rev-g  
p160-Tat/revコーディング配列をコードするHIVの本質的なゲノ  
ム断片が用いられた。以下に詳述されるように、これはgp160の高水準の発  
現を得るための標準選系である。また、これは、Tatの発現がカポジ肉腫の進  
行に寄与するため、潜在的な危険性を有する。

WO93/17706号にはウイルスに対して動物をワクチン接種する方法が  
記述されており、この方法では抗体粒子が遺伝子構築体で被覆され、その被覆粒  
子が加速されて動物の細胞に入れられた。HIVに関しては、末端反復配列を除  
く、本質

的にゲノム全体を用いることが提案された。一般に、ワクチンの安全性を保证す  
るため、HIVの構築体はHIVのゲノムの約50%以上を含むべきではないと  
信じられている。そうすることにより、その多くが未知の、又は理解が乏しい機  
能を有する酵素的部分及びウイルス調節タンパク質の除去が確実になる。このよ  
うに、有用なヒトHIVワクチンが遺伝子送達技術から現れるかどうか幾つかの  
問題が残っている。

本発明では、ポリヌクレオチドを生体組織に導入してタンパク質の発現を誘発  
する既知の方法のいずれもが考慮されている。しかしながら、本発明は、HIV

及び他のタンパク質を抗原処理経路に導入してHIV特異的CTL及び抗体を効果的に産生させるための新規免疫原を提供する。この医薬品は、細胞性及び体液性の両者の抗-HIV及びHIV中和免疫応答を誘発するワクチンとして有用である。本発明においては、上述の問題に対する取り組みが行われ、動物体内に導入されたときにそれらの方法に付随する危険性を伴うことなくHIVタンパク質及びエプシトープの効率的な発現を導くポリヌクレオチド免疫原を提供することにより解決されている。このようにして生成した免疫応答は、HIVの認識、HIVの複製の阻害、HTVに感

染した細胞を同定して殺すことに有効であり、かつ多くのHIV株に対して交差反応性である。

#### 4. コドンの用法及びコドンコンテキスト

生物のコドン形成は高度に非ランダムであり、生物間で異なる。この情報は所望の水準の翻訳効率を有する改変もしくは合成遺伝子の構築及び発現、ゲノムのどの領域がタンパク質コーディング領域であるのかの決定、異種遺伝子への翻訳停止部位の導入、及びヌクレオチド配列の関係又は系統起源の確認に用いられる。

形質転換生物における外来異種遺伝子の発現は今日日常的なものである。例えばネズミ及びヒト遺伝子を含む多くの哺乳動物遺伝子が単細胞生物にうまく挿入されている。これに関する標準技術には、プラスミドもしくはファージのようなベクターに発現させようとする外来遺伝子を導入し、そのベクターを生物への遺伝子の挿入に用いることが含まれる。そのような遺伝子の本来のプロモーターは、一般に、その遺伝子が挿入される宿主に適合する強力なプロモーターと置換される。タンパク質配列決定機器は、例えば微量であっても、天然タンパク質のアミノ酸配列を明らかにすることを可能にする。これらのアミノ酸

配列から、それらのタンパク質をコードするDNA配列を推定することができる。DNA合成も急速に発展している技術であり、これらの推定DNAに相当する合成遺伝子を容易に構築することができる。

発現系及び組換えDNAの知識の前身にもかかわらず、生物において外来もしくは合成遺伝子を発現させようと試みる場合には重大な障害が残っている。例えば、多くの天然の活性タンパク質は、それらが外来宿主において発現される場合に生じるものとは異なる様式でグリコシル化される。このため、多くの哺乳動物遺伝子を発現させるための細菌宿主に酵母のような真核生物宿主が好ましいことがある。グリコシル化の問題は継続する研究の主題である。

別の問題はより理解が乏しい。合成遺伝子の翻訳は、強力なプロモーターと組み合わせた場合であっても、しばしば予想よりも非常に劣る効率で進行する。同じことが発現生物にとって外来性の外来遺伝子にもよく当てはまる。回収可能な量の翻訳産物が生成する十分に効率的な様式で遺伝子が転写される場合であっても、そのタンパク質はしばしば不活性であるか、又はその本来のタンパク質とは特性が何らかの点で異なる。

後者の問題は、通常、様々な生物におけるタンパク質の折り畳みの相違のためであると認識されている。この問題の解決法はわかりにくく、タンパク質の折り畳みを制御する機構に対する理解は不十分である。

翻訳効率に関連する問題はコドンコンテキスト効果に関連するものと信じられている。全ての生物におけるタンパク質コーディング領域は様々な機能的な束縛を受けており、その幾つかは適切な翻訳開始及び停止シグナルに加えて適切に作用するタンパク質をコードする必要性に依存している。しかしながら、これらの束縛の点からは容易に理解できないタンパク質コーディング領域の幾つの特徴が認められている。このような特徴の重要な分類はコドンの用法及びコドンコンテキストに関連している。

コドンの使用は非常に偏向していて、異なる生物の間で大きく変化することが知られている。コドンの使用パターンはtRNAアイソアセプターの相対量に関連することが示されている。多量のタンパク質をコードする遺伝子と少量のタンパク質をコードする遺伝子とはコドン優先度が相違している。コドンの使用における偏向がペプチド伸長速度を変更する可能性は広く論

じられている。コドンの使用における相違は翻訳速度の相違に関連するが、翻訳に対するコドン選択の直接効果を示すことは困難である。コドン使用パターンに関する他の提示される束縛には翻訳の忠実度の最大化及びタンパク質合成の動力的効率の最適化が含まれる。

コドンの非ランダム使用とは別に、コドン／アンチコドン認識がコドンそれ自体の外部の配列によって影響を受ける、“コドンコンテキスト”と呼ばれる現象のかなりの証拠が蓄積されている。非センスコドンはもちろんミスセンスコドンの抑制の効率に対する近傍ヌクレオチドの強力な影響が存在する。明らかに、天然の細菌集団における多量のサプレッサー活性はもちろん、セレノシステイン及びホスホセリンをコードする“終止”コドンの使用も終止がコンテキスト依存性であることを必要とする。類似のコンテキスト効果は、翻訳の忠実度はもちろん、翻訳開始の効率にも影響を及ぼすことが示されている。

大腸菌のタンパク質コーディング領域の統計分析は“コドンコンテキスト”の別の表出を示している。ある位置での特定のコードンの存在は隣接するコードンにおける特定のヌクレオチドの出現頻度に影響を及ぼし、これらのコンテキストの束縛は高水

準で発現する遺伝子と低水準で発現する遺伝子とは顕著に異なる。コンテキスト効果は認識されているが、コードンに隣接する好ましいヌクレオチドに関連する統計的規則の推定される価値は比較的低い。これは、所望の水準の翻訳効率を達成するためのコードンの選択のためにこのようなヌクレオチド優先度データの利用を制限している。

自動ヌクレオチド配列決定機器の出現は様々な生物の多量の配列データを利用可能にしている。それらのデータの理解は実質的な困難を提示する。例えば、遺伝子配列データをタンパク質の配列に関連付けるためには、そのゲノムのコーディング領域を特定することが重要である。加えて、特定の生物のゲノムの系統が実質的関心事である。幾つかの生物のゲノムは系統が混ざり合ったものであることが知られている。現在、ウイルス起源の配列の幾つかが真核生物のゲノムに安定に組み込まれている。これらウイルス配列それ自体は別の実質的に関連のない

種に由来するものである可能性がある。遺伝子の系統の理解は、他の生物における関連遺伝子とそれらの翻訳産生物との適切な類似性を引き出す上で重要である可能性がある。

翻訳に対するコドンコンテキスト効果のより良好な理解、及

びあらゆる所望の翻訳効果に適するコドンを選定する方法が必要とされる。また、ヌクレオチド配列データからゲノムのコーディング領域を特定する方法も必要とされる。さらに、タンパク質の折りたたみを制御し、かつ外来遺伝子が宿主において発現したときに適切に折りたたまれることを保証する方法も必要とされる。所望の翻訳効率に従って変更又は構築された遺伝子は非常に価値のあるものである。

産業上及び製薬上関心のあるタンパク質を微生物によって発現させるための組換えDNA技術の実施の別の側面は“コドン優先度”である。遺伝子発現のための既存の機構は遺伝的に形質転換された宿主細胞が所定かつ所望の産物を構築するように“作動する”というものであることは以前に言及されているが、微生物内で達成される発現の水準は、部分的には挿入された外来遺伝子内に存在するアミノ酸特異的遺伝暗号の特定の代替形態に依存して広範な変動を受ける可能性がある。4種類の可能性のあるヌクレオチド塩基の“トリプレット”は64種類の異なる形態で存在し得る。これらの形態が（転写開始及び終止に加えて）わずか20種類の異なるアミノ酸のメッセージを提供することは、幾つかのアミノ酸が2つ以上のコドン

でコードされ得ることを意味する。実際、幾つかのアミノ酸は6種類もの“余分の”代替コドンを有し、これに対して別の幾つかのものは単一の必要とされるコドンを有する。完全には理解されていない理由により、代替コドンは異なる細胞型の外来DNA内に完全に均一に存在するわけではなく、特定の細胞型においては特定のコドンに対する可変の天然隔隔もしくは“優先度”が存在するように思われる。

一例として、アミノ酸ロイシンはCTA、CTC、CTG、CTT、TTA及



びTTG（それぞれ、mRNAコドン、CUA、CUC、CUG、CUU、UUA及びUUGに対応する）を含む6つのDNAコドンのいずれかによって指定される。微生物のゲノムコドン頻度の徹底的な分析により、大腸菌の外来DNAが最も一般的にはCTGロイシン指定コドンを含み、これに対して酵母及び粘菌のDNAが最も一般的にはTTAロイシン指定コドンを含むことが明らかになっている。この階層の観点から、大腸菌宿主によってロイシンに富むポリペプチドの高水準の発現が得られる可能性がある程度はコドン使用の頻度に依存するものと一般に考えられる。例えば、TTAに富む遺伝子は全ての可能性において大腸菌における発現に劣り、これ

に対してCTGに富む遺伝子はおそらく高度にポリペプチドを発現する。同様に、酵母細胞がロイシンに富むポリペプチドを発現させるために計画された形質転換宿主細胞である場合、挿入されるDNAにおける使用に好ましいコドンはTTAである。

組換えDNA技術に関するコドン優先現象の暗示は明白であり、この現象は、うまく形質転換された宿主生物において外来遺伝子の高発現水準を達成することの従来の多くの失敗を説明している。“好ましき”に劣るコドンが挿入された遺伝子内に繰り返し存在し、その宿主細胞の発現のための機構が効率的に作動していない可能性がある。この現象は、計画された宿主細胞の好ましいコドンを含むように設計されている合成遺伝子が組換えDNA技術を実施するのに好ましい形態の外来性遺伝物質を提供することを示唆する。

##### 5. タンパク質の輸送

真核細胞を分類する機能の多様性はそれらの膜境界の構造的な分化に依存している。これらの構造を生成し、かつ維持するためには、タンパク質が、小胞体内のそれらの合成部位から細胞を通して予め決められた目的地に輸送されなければならない。これは、その輸送されるタンパク質が、主要輸送経路への接触

点に位置する経路選択の主因である分子機構によって認識される選別信号を示すことを必要とする。大部分のタンパク質の選別決定は、それらの最終目的地、そ

れらがその機能を発揮する細胞内の位置、がそれらの恒久的な滞留地となるため、それらがそれらの生合成経路を経るときに1回だけなされることが必要である。

細胞内の整合性の維持は、部分的には、タンパク質の選択的な選別及びそれらの正しい目的地への正確な輸送に依存する。過去数年にわたり、タンパク質の極端的設定及び局在化のための分子機構の精査が活発に研究されている。'宛先ラベル'として作用し得るタンパク質上に定義された配列モチーフが同定されている。多くの選別信号が膜タンパク質の細胞質ドメインに関連することが見出されている。

#### 発明の要約

ペプチド又はタンパク質をコードするDNA配列を含む合成ポリヌクレオチドが提供される。この合成ポリヌクレオチドのDNA配列は非同種宿主における発現に最適化されたコドンを含む。本発明はHIV envはもちろんのことHIV envの改変をもコードする合成DNA分子によって例示される。

この合成分子のコドンには計画された宿主細胞の好ましいコドンが含まれる。この合成分子は外来性遺伝物質の好ましい形態を提供する。この合成分子は、中和抗体及び細胞介在免疫によりHIV感染に対する有効な免疫予防を提供するポリヌクレオチドワクチンとして用いることができる。本発明は、霊長類及びヒトのような哺乳動物を含む脊椎動物にイン・ビボで直接導入されたときに、コードされたタンパク質の発現をその動物体内に誘発するポリヌクレオチドを提供する。

#### 図面の簡単な説明

図1はHIV envカセットに基づく発現方策を示す。

図2はDNAワクチン媒介抗-gp120応答を示す。

図3はネズミDNAワクチン接種受容動物の血清の抗-gp120ELISA力値を示す。

図4はHIV env PNV細胞培養物形質移入の後のgp120の相対発現を示す。

図5はtPA-gp143/oPtA対oPtB DNAワクチン接種の後の

平均抗-g p120ELISA応答を示す。

図6はネズミDNAワクチン接種受容動物の血清によるHIVの中和を示す。

図7はネズミHIV env DNAワクチン接種受容動物からの血清によるHIV中和を示す。

図8は最適化されたHIV env DNA構築体の免疫プロット分析である。

図9はgp140DNA及びogp160タンパク質を最終的にワクチン接種した後のアカゲザルにおける抗-gp120ELISA応答を示す。

図10は最終ワクチン接種後のアカゲザルのSHIV中和抗体応答を示す。

#### 発明の詳細な説明

ペプチド又はタンパク質をコードするDNA配列を含む合成ポリヌクレオチドが提供される。この合成ポリヌクレオチドのDNA配列は非同種宿主における発現に最適化されたコドンを含む。本発明はHIV envをコードする合成DNA分子によって例示されることに加えて、HIV envの改変も提供される。この合成分子のコドンには計画された宿主細胞の好ましいコドンが含まれる。この合成分子は外來性遺伝物質の好ましい形態を提供する。この合成分子は、中和抗体及び細胞介在免疫によりHIV感染に対する免疫学的予防を提供するポリヌ

クレオチドワクチンとして用いることができる。本発明は、霊長類及びヒトのような哺乳動物を含む脊椎動物にイン・ビボで直接導入されたときに、コードされたタンパク質の発現をその動物体内に誘発するポリヌクレオチドを提供する。

したがって、HIV envをコードする合成DNA分子及びHIV envの改変された形態をコードする合成DNA分子が提供される。この合成分子のコドンは計画された宿主細胞によって好まれるコドンを用いるように設計される。上述のように、本発明のこの部分の合成分子は、中和抗体及び細胞媒介免疫によってHIV感染に対する有効な免疫学的予防を提供するポリヌクレオチドワクチンとして用いることができる。この合成分子は免疫原組成物として用いることができる。また、本発明のこの部分は、霊長類及びヒトのような哺乳動物を含む脊

椎動物にイン・ビボで直接導入されたときに、コードされたタンパク質の発現をその動物体内に誘発するポリヌクレオチドをも提供する。

ここで用いられる場合、ポリヌクレオチドは、生きている脊椎動物細胞に導入されたときにその細胞の機構をそのポリヌクレオチドを含む遺伝子によってコードされる翻訳産物を生成す

るよう導くことが可能であるような必須調節要素を含む核酸である。本発明の態様においては、このポリヌクレオチドは、転写プロモーターに作動的に連結する少なくとも1つのHIV遺伝子を含むポリデオキシリボ核酸である。本発明の別の態様においては、ポリヌクレオチドワクチン(PNV)は、真核細胞の機構(リボソーム、tRNA、及び他の翻訳因子)による翻訳を受容可能な少なくとも1つのHIV遺伝子をコードするポリリボ核酸を含む。このポリヌクレオチドによってコードされるタンパク質が病理学的状態を除く動物に通常生じることがないもの(すなわち、異種タンパク質)、例えば、ヒト免疫不全ウイルスに関連するタンパク質、(HIV)、後天性免疫不全症候群の病因学的作用因子、(AIDS)である場合、その動物の免疫系は防御免疫応答を開始するように活性化される。これらの外来性タンパク質はその動物の組織によって生成されるため、発現したタンパク質は主要組織適合性系、MHCによって関連生物(HIV)が実際に感染した場合と類似する方式で処理される。本開示において示されるように、その結果は同種病原体に対する免疫応答の誘発である。

したがって、本発明者らは、生物学的系に導入されたときに

HIVタンパク質及びエピトープの発現を誘発する核酸を調製している。誘発された抗体応答は両者共に発現したHIVタンパク質に特異的であり、HIVを中和する。加えて、HIV感染細胞を特異的に認識して破壊する細胞毒性Tリンパ球が誘発される。

本発明は、哺乳動物の組織に導入されたときに、単細胞内にイン・ビボで分散した遺伝子産物の発現を誘発するポリヌクレオチドの使用法を提供する。本発明は、rev-非依存性遺伝子を得るのにrev依存性HIV遺伝子の複製の

操作を必要としない異なる解決法を提供する。ここに記述される rev-非依存性発現系はそれ自体の資質として有用であり、単細胞におけるイン・ビボでの単一の所望の遺伝子産生物の発現を示すための系である。

本発明の用途の多くが抗ウイルスワクチンに適用されるため、このポリヌクレオチドはしばしばポリヌクレオチドワクチン、又はPNVと呼ばれる。これは、免疫刺激及び抗腫瘍治療におけるこれらのポリヌクレオチドのさらなる有用性を本発明の範囲外とするものではない。

本発明の一態様においては、HIV遺伝子産生物をコードす

る遺伝子が発現ベクターに組み込まれる。このベクターは真核生物のRNAポリメラーゼによって認識される転写プロモーターを含み、かつHIV遺伝子コーディング領域の末端に転写ターミネーターを含む。好ましい態様において、このプロモーターは、多くの他の既知プロモーター、例えば、強力な免疫グロブリン又は他の真核生物遺伝子プロモーターを用いることができることを当該技術分野における熟練者は認識するであろうが、イントロンA配列を有するサイトメガロウイルスプロモーター(CMV-intA)である。好ましい転写ターミネーターはウシ成長ホルモンターミネーターである。CMV-intA-BGHターミネーターの組み合わせが特に好ましい。

原核生物におけるポリヌクレオチドの調製を助けるため、真核生物細胞において抗生物質の発現が生じないように原核生物プロモーター転写制御の下で、抗生物質耐性マーカーも発現ベクターに好ましく含められる。アンピシリン耐性遺伝子、ネオマイシン耐性遺伝子及び他の薬学的に許容し得る抗生物質耐性マーカーを用いることができる。原核細胞における発酵によるポリヌクレオチドの高水準の産生を助成するため、ベクターが原核生物の複製起点を含み、かつ高コピー数のものであること

が有利である。幾つかの商業的に入手可能な原核生物クローニングベクターがこれらの利点をもたらす。非必須DNA配列は除去することが望ましい。また、このベクターは真核生物細胞において複製できないことが望ましい。これは、ポリ

ヌクレオチドワクチンの配列がレシピエントのゲノムに組み込まれる危険性を最小にする。ポリヌクレオチドの発現を特定の組織型に限定することが望まれる場合には、組織特異的プロモーター又はエンハンサーを用いることができる。

態様の1つにおいては発現ベクターpnrSVが用いられ、このベクターではラウス肉腫ウイルス(RSV)末端反復配列(LTR)がプロモーターとして用いられる。別の態様においては、CMVプロモーター及びBGH転写ターミネーターがクローン化された突然変異pBR322ベクターであるV1が用いられる。別の態様においては、V1及びpUC19の要素を組み合わせてV1Jと呼ばれる発現ベクターが生成されている。V1J又は他の所望の発現ベクターにはHIV遺伝子、例えば、gp120、gp41、gp160、gag、pol、env、又は抗-HIV免疫応答を誘発することが可能な他のあらゆるHTV遺伝子がクローン化される。別の態様においては、アン

ビシリン耐性遺伝子がV1Jから除去され、かつネオマイシン耐性遺伝子に置き換えられてV1J-neoが生成され、これには本発明に従って用いるために異なるHIV遺伝子がクローン化されている。別の態様においてはこのベクターはV1Jnsであり、これは独自のSfiI制限部位がV1J-neoの2114位の単一のKpnI部位に加工により組み込まれていることを除いてV1Jneoと同じである。ヒトゲノムDNAにおけるSfiI部位の出現頻度は非常に低い(100,000塩基当たり約1部位)。したがって、このベクターは、抽出されたゲノムDNAを単にSfiI消化することにより宿主DNAへの発現ベクターの組み込みを注意深く監視することを可能にする。さらなる改良においては、ベクターはV1Rである。このベクターにおいては、非常に小型のベクターを生成するため、可能な限りの非必須DNAがベクターから“切り取られ”た。このベクターはV1Jnsの誘導体である。このベクターは、望ましくない配列がコードされることを気にすることなくより大きなインサートを用いることを可能にし、細胞による取り込みを最適化する。

本発明の態様は、HIV gp160、gp120、gag

及びHIVの実験室適合株、例えば、SF2、111BもしくはMNに由来する遺伝子産物をコードする遺伝子を含む。当該技術分野における熟練者は、HIV-1に由来する遺伝子に類似する機能を有するHIV-2株に由来する遺伝子の使用がHIV-1構築体についてここに記述されるものに類似する免疫応答を生成するものと予想されることを認識するであろう。これらの遺伝子を得るためのクローニング及び操作方法は当該技術分野における熟練者に公知である。

HIVの実験室適合株に対する免疫応答の誘発がHIVの主要野外単離体の中和をもたらすのに適するものではない可能性があることは認識される。したがって、本発明の別の態様においては、HIVの毒性主要野外単離体由来する遺伝子がポリヌクレオチド免疫原に組み込まれる。これは、このウイルス遺伝子のcDNAコピーを調製した後、個々の遺伝子をポリヌクレオチド免疫原にサブクローニングすることにより達成される。多くのHIV株の多くの遺伝子の配列が現在公的にGENBANKから入手可能であり、このようなHIVの主要野外単離体は、これらの株を利用可能とするためにクオリティ・バイオリジカル社(Quality Biological, Inc.)

[7581 リンドバーク・ドライブ、ゲイザースバーグ、メリーランド20879]と契約している国立アレルギー及び感染症研究所(National Institute of Allergy and Infectious Diseases)(NIAID)から入手可能である。また、このような株は世界保健機構(WHO) [HIVの単離及び特徴付けのためのネットワーク(Network for HIV Isolation and Characterization)、ワクチン開発ユニット(Vaccine Development Unit)、研究局(Office of Research)、AIDSに関する世界的プログラム(Global Programme on AIDS)、CH-1211ジュネーブ27、スイス]からも入手可能である。この研究から、当該技術分野における熟練者は、本発明の有用性の1つが、HIVの配列の多様性とHIVの中和の血清学との相関を他のパラメーターに加えて作成することができるように、イン・ビボはもちろんのことイン・ビトロでの試

験及び分析のための系を提供することであることを認識するであろう。H1V株の主要単離体由来する遺伝子の組み込みにより、このウイルスの

臨床的な単離体に対する免疫応答を誘発し、したがって、当該分野において未だに満たされていない必要性を満たす免疫原が提供される。さらに、毒性単離体に変化するに従い、必要に応じて新しい配列を反映するようにこの免疫原を改変することができる。

川調の一貫性を保つため、ここではポリヌクレオチド免疫原構築体の記述に当たり以下の慣例に従う：“ベクター名称-H1V株-遺伝子-追加要素”。したがって、MN株のgp160遺伝子が発現ベクターV1Jneoにクローン化されている構築体は、ここで与えられる名称は：“V1Jneo-MN-gp160”である。この構築体に加えられる追加要素は以下にさらに詳細に説明される。ウイルスの病原株が変化するため、医療に組み込むのに最適である正確な遺伝子は変化し得る。しかしながら、以下に示されるように、異種株に対して防御することが可能なCTL応答が誘発されるため、全ウイルス又はサブユニットポリペプチドベースのワクチンと比較して、本発明の免疫原及びワクチンにおいては株の変異性はそれほど重要ではない。加えて、この免疫原は新製造遺伝子を挿入する操作が容易であるため、これは分子生物学の標準技術によって容易になさ

れる測然である。

ここで用いられる“プロモーター”という用語は、RNAポリメラーゼが結合するDNA鎖上の認識部位を指す。プロモーターはRNAポリメラーゼと開始複合体を形成し、転写活性を惹起して駆動する。この複合体は、“エンハンサー”と呼ばれる活性化配列又は“サイレンサー”と呼ばれる阻害配列によって改変することができる。

ここで用いられる“リーダー”という用語は、遺伝子と共に転写される、構造遺伝子の5'末端のDNA配列を指す。リーダーは、通常、しばしばプロ配列と呼ばれるN-末端ペプチド伸長を有するタンパク質を生じる。細胞外の媒体又は膜のいずれかに分泌されることが運命付けられているタンパク質については、



般には疎水性であるこのシグナル配列はそのタンパク質を小胞体内に導き、そのタンパク質はここから適切な目的地に放出される。

ここで用いられる“イントロン”という用語は、遺伝子産生物内のアミノ酸をコードしない、遺伝子中央部に生じるDNAの区画を指す。イントロンの前駆体RNAは切除され、したがってmRNAに転写されることもタンパク質に翻訳されること

もない。

“カセット”という用語は、発現させようとする核酸配列を含む本発明の配列を指す。カセットは、概念上は、カセットテープに類似する。各々のカセットはそれ自体の配列を有する。したがって、カセットを交換することにより、そのベクターは異なる配列を発現する。5'及び3'末端の制限部位のため、カセットは容易に挿入し、除去し、又は別のカセットと置き換えることができる。

“3'非翻訳領域”又は“3'UTR”という用語は、通常その遺伝子と共に転写される、構造遺伝子の3'末端の配列を指す。この3'UTR領域は通常ポリA配列を含む。この3'UTRはDNAから転写されるが、タンパク質に翻訳される前に切除される。

“非コーディング領域”又は“NCR”という用語は、構造遺伝子の3'UTR領域に近接する領域を指す。このNCR領域は転写終止シグナルを含む。

“制限部位”という用語は制限エンドヌクレアーゼの配列特異的開裂部位である。

“ベクター”という用語は、DNA断片を宿主生物又は宿主

組織に導入することが可能な幾つかの手段を指す。プラスミド、バクテリオファージ及びコスミドを含む様々な型のベクターが存在する。

“有効量”という用語は、適切な水準のポリペプチドを産生するのに十分なPNVが注射されることを意味する。当該技術分野における熟練者はこの水準が変化し得ることを認識する。

本発明を説明するため、以下のHIVに関する背景を説明する。ヒト免疫不全

ウイルスはリボ核酸(RNA)ゲノムを有する。このRNAゲノムは、ここで教示される方法に従ってクローン化及び操作するためのcDNAコピーを生成するため、当該技術分野において公知の方法に従って逆転写されなければならない。このゲノムの各末端はプロモーターとして作用する末端反復配列である。これらの末端の間で、このゲノムは、様々なリーディングフレームにおいて、gag-pol-envを主要遺伝子産物としてコードしている(gagはグループ特異的抗原であり、polは逆転写酵素、又はポリメラーゼであり、また、この領域によって、代わりのリーディングフレームにおいて、例えばgp160のgp120及びgp41への、翻訳後処理の原因となるウイルスプロテアーゼがコードされ、

envはエンベロープタンパク質であり、vifはポリオン感染性因子であり、revはポリオンタンパク質発現の調節因子であり、nefは陰性調節因子であり、vpuはポリオン生産性因子“u”であり、tatは転写のトランス活性化因子であり、vprはウイルスタンパク質rである)。これらの要素の各々の機能は記述されている。

本発明の一態様においては、HIV又はSIVタンパク質をコードする遺伝子が転写プロモーターに直接連結される。env遺伝子は大きな膜結合タンパク質gp160をコードし、これは翻訳後にgp41及びgp120に改変される。gp120遺伝子は発現のためにサイトメガロウイルスプロモーターの制御の下に配置することができる。しかしながら、gp120は膜に結合せず、したがって、発現の際に細胞から分泌され得る。HIVは感染細胞内で休止状態に留まる傾向があるため、細胞結合HIVエпитープに対する免疫応答も生じることが望まれる。加えて、ウイルスの中和に最も有効な抗体応答を生成させるため、ウイルス感染によって生じるものに構造上類似する膜結合オリゴマーENV抗原ワクチンが産生することが望ましい。この目的は、分泌gp140エпитープ(gp140>gp

120+gp41の外部ドメイン)又は細胞膜会合エпитープgp160をイン

ビオ発現させて免疫応答を開始させることにより、本発明において達成される。しかしながら、g p 1 6 0の発現は、revが存在しない状態では、非スプライス遺伝子の核から搬出されないために抑制される。この系を理解するためには、H I Vの生活環をさらに詳細に説明しなければならない。

H I Vの生活環において、宿主細胞の感染の際、H I V RNAゲノムがプロウイルスDNAに逆転写され、単一の転写単位として宿主のゲノムDNAに組み込まれる。そのLTRはプロモーターをもたらし、これがH I V遺伝子を5' から3'の方向(g a g、p o l、e n v)に転写して全ゲノムの非スプライス転写体を形成する。この非スプライス転写体はmRNAとして作用し、そこからg a g及びp o lが翻訳され、これに対してe n vをコードする遺伝子の翻訳には制限付きのスプライシングが生じなければならない。調節遺伝子産生物revが発現するためには、このゲノムの設定においてはrev及びe n vが重複しているため、2以上のスプライシング現象が生じなければならない。e n vの転写が生じるためにはrevの転

写が停止しなければならない、逆も同様である。加えて、核からの非スプライスRNAの搬出にはrevが存在することが必要である。しかしながら、revがどのように作用するためには、rev応答性要素(RRE)が転写体上に存在しなければならない[Mallimら、Nature 338:254-257(1989年)]。

本発明のポリヌクレオチドワクチンにおいては、完全にスプライスされた遺伝子を提供することにより(すなわち：リーディングフレームの切り替え又は非コーディング領域の除去を必要としない、所望の遺伝子産生物の完全なオープンリーディングフレームの提供；当該技術分野における通常の技術を有する者は特定の遺伝子をスプライスしたときに生じるその遺伝子に幾らかの許容範囲が存在することを認識する；しかしながら、機能的なコーディング領域が得られる限りこれは許容される)、この特定のH I V遺伝子の必須スプライスが排除されている。したがって、態様の1つにおいては、各遺伝子産生物の断続的な発現が必要とないようにg p 1 6 0の全コーディング領域がスプライスされる。

本発明によって生じる二重の体液性及び細胞性免疫応答は、

H I Vがその集団内はもちろんのこと感染した個体においても突然変異を生成する傾向を考えると、H I V感染の阻止に特に重要である。H I Vに有効な防御ワクチンを処方するためには、例えばg p 1 6 0 (e n vは、U Sヒト集団に蔓延する株であるH I V-1、分枝群B株全体にわたって約8 0 %保存されている)、H I Vの主要中和標的、はもちろん、g p 1 6 0の保存部分及びg a gによってコードされている内部ウイルスタンパク質に対して反応性の細胞毒性T細胞に対する多価抗体応答の両者を生成させることが望ましい。我々は、通常の実験室株；感染集団内に見出される優性主要ウイルス単離体；抗体エпитープを中和する交差株を暴露するように設計された変異g p 1 6 0；及びg a g及びp o 1 遺伝子（H I V単離体全体にわたって～9 5 %保存されている）のような他の代表的なH I V遺伝子から選択されるg p 1 6 0遺伝子を含むH I Vワクチンを作製している。

免疫不全状態に陥んでいない事実上全てのH I V血清陽性患者が抗-g a g C T Lを有し、これに対してこれらの患者の約6 0 %は交差株g p 1 6 0特異的C T Lを示す。しかしながら、A I D Sとして知られる疾患状態まで進行している感染例

体に見出されるH I V特異的C T Lの量は非常に少なく、このことは、交差株C T L応答を誘発することができるという我々の発見の重要性を示している。

我々のe n v及びg a gポリヌクレオチドワクチン構築体によって誘発された免疫応答はマウス及び霊長類において示される。e n vに対する抗体の産生をマウスにおいて監視することにより、所定の構築体が適切に免疫原性であること、すなわち、ワクチン接種された動物の高い割合が抗体応答を示すことを確認することができる。また、マウスは、我々の構築体によるC T L誘発を試験するのに適する安易な動物モデルをもたらし、したがって、特定の構築体がそのような活性を生成することが可能であるかどうかを評価するのに用いられる。サル（アフリカザル、ミドリザル、アカゲザル、チンパンジー）は、より大きな非げっ歯類

動物における抗体評価のための霊長類を含むさらなる種をもたらす。また、これらの種は、マウス血清中に観察されるレトロウイルスに対する高水準の内在性中和活性のため、抗血清中和検定を行う上でマウスよりも好ましい。これらのデータは、チンパンジー／HIV<sub>III</sub> 追加抗原モデルにおける実験において、この系について既知の中和抗体の防御水準

に基づく防御を達成するのに十分な免疫原性が我々のワクチンによって生じることを示す。しかしながら、現在科学団体において浮かび上がり、徐々に受け入れられている防御の定義は、HIV感染の完全な防御を示す、いわゆる“無菌化免疫”から疾患の予防に常に移りつつある。この目的の幾つかの関連項目には、HIV逆転写酵素活性、血清試料の感染性、血液中のp24又は他のHIV抗原の濃度のELISA検定、増加するCD4<sup>+</sup>T細胞濃度、及び生存率の拡大のいずれかによる測定での血液ウイルス力価の減少が含まれる〔例えば、抗-HIVワクチンの効力の定義を進展させることの考察については、Cohen, J., Science 262:1820-1821, 1993年を参照〕。また、本発明の免疫原は、HIVの感染性（臨床的、主要野外）単離体に対する中和免疫応答も生成する。

#### 免疫学

##### A. envに対する抗体応答

1. gp160およびgp120 ELISA検定を用いて、分泌gp120又は膜結合gp160のいずれかを発現するワクチンベクターがenv特異的抗体の産生に有効であるかどうか

かを決定する。我々のワクチン接種ベクターによるenv発現の初期イン・ビトロ特徴付けはgp160形質移入細胞溶解物の免疫ブロット分析によりもたらされる。これらのデータは、形質移入細胞のgp160発現を可視化する抗-gp41及び抗-gp120モノクローナル抗体を用いて、gp160の発現を確認し定量化する。本発明の一態様においては、以下の理由によりgp160がgp120より好ましい：（1）初期gp120ベクターはマウスにおいては矛盾し

た免疫原性をもたらし、ミドリザルにおいては応答性が非常に乏しいか、もしくは非応答性であった；(2) gp160は、gp41を抱合することによる約190アミノ酸残基の追加をもたらすことにより、追加の中和抗体はもちろんのことCTLエпитープにも奇与する；(3) gp160の発現は4量体組立体及び全体の立体配座に関してウイルスenvにより類似し、これはオリゴマー依存性中和エпитープをもたらし得る；および(4) 我々は、マウス、フェレット、及び非ヒト霊長類において中和抗体を産生させるための膜結合インフルエンザHA構築体の成功 [Uimerら, *Science* 259:1745-1749; Montgomery, D. 5, DNA and Cell Biol. 12:777-783, 1993年を参照] と同様に、抗-gp160抗体の産生が抗-gp120抗体の産生を上回ることを見出ししている。どの型のenvが好ましいか、又はenvサブ断片のカタデルが好ましいかどうかの選択は以下に概説される実験によって決定される。

2. 中和活性の存在及び広さ サルに由来するELISA陽性抗血清を試験し、それが同種及び非同種HIV株の両者を中和することを示す。

3. V3対非V3中和抗体 env PNVについての主な目的は広範な中和抗体を生成することである。V3ループに対する抗体が非常に株特異的であることが今や示されており、かつこの応答の血清学が株の定義に用いられている。

a. 非V3中和抗体は、CD4結合の原因である、gp120内の不連続構造エпитープを主として認識するように思われる。このドメインに対する抗体はポリクローナルであり、おそらくはそのウイルスが細胞リガンドに結合することと必要とすることにより強要される、突然変異の抑止のために、より広範に交差中和する。免疫動物の血清により96ウェルプレートに固定化されたCD4へのgp120の結合のブロックを試

験するのにイン・ビトロ検定が用いられる。第2のイン・ビトロ検定は、プラスチック上に固定化された、選択されたV3ドメインに相当する合成ペプチドへの直接抗体結合を検出する。これらの検定は、我々の研究において用いられるいず

れの動物の型に由来する抗血清にも適合し、我々のワクチンが産生する中和抗体の型を決定することはもちろん、ウイルス中和とのイン・ビトロ相関も提供する。

b. gp41は少なくとも1つの主要中和決定基を有し、これは、広範に中和する2F5モノクローナル抗体(バイラル・テストング・システムズ社(Viral Testing Systems Corp. ), テキサス・コマース・タワー、600トラビス・ストリート、スート4750、ヒューストン、TX77002-3005 (USA)、又はバルトハイム・ファルマツォイチカ(Waldheim Pharmazeutika) GmbH、ボルツマンガッセ11、A-1091 ウィーン、オーストリアから商業的に入手可能)によって認識される高度に保存された直鎖エピトープと、gp41のN-末端に位置する十分に保存された“融合タンパク質”ドメインを含む他の潜在的部位に相当する。上述の免疫プロットによるgp

41に対する抗体の検出に加えて、プラスチックに固定化されたこれらドメインが提示している合成ペプチドに結合する抗体のためのイン・ビトロ検定試験が利用される。

4. 抗体応答の成熟 HIV血清陽性患者においては、中和抗体応答が主として抗-V3から、gp41エピトープを含む、上述の(#3)構造gp120ドメインエピトープを含むより広範に中和する抗体を含むものへと進行する。これらの型の抗体応答を時間及び引き続くワクチン接種の全過程両方にわたって監視する。

#### B. env及びgagに対するT細胞反応性

1. CTL応答の生成 細胞内で合成されるウイルスタンパク質はMHC I制限CTL応答を生成する。これらのタンパク質の各々が血清陽性患者においてCTLを誘発する。我々のワクチンもまた、マウスにおいてCTLを誘発することが可能である。マウス株の免疫原性は、インフルエンザNPで示されるように、このような研究の助けとなる[Ulmerら, Science 259:1745-1749, 1993年を参照]。従つかのエピトープがHIVタンパク質、

env、rev、nef及びgagについてBalb/cマウスにおいて定義され

ており、それによりイン・ビトロCTL培養及び細胞毒性検定が容易になっている。これらの遺伝子が形質移入された、ネズミ肥満細胞腫P815のような同系腫瘍系を、CTLはもちろんイン・ビトロ抗原特異的再刺激の標的を提供するのに用いることが有利である。MHCクラスI制限細胞毒性Tリンパ球を誘発することが可能な免疫原を定義する方法は公知であり[Calin-Laurensら、Vaccine 11(9):974-978、1993年を参照；特に、Erikssonら、Vaccine 11(8):859-865、1993年を参照、ここでは、HIV gp120上のT細胞活性化エピトープが宿主類似においてマッピングされており、gp120アミノ酸142-192、296-343、367-400、及び410-453を含む幾つかの領域が各々リンパ球増殖を誘発することが見出された；さらに、不連続領域248-269及び270-295がリンパ球増殖性であった。アミノ酸152-176を含むペプチドもHIV中和抗体を誘発することが見出された]、これらの方法は、本発明のPNVに含めるための免疫原性エピトープの同定に用いることができる。あるいは、gp160、gp120、プロテアーゼ、又はgagをコード

する遺伝子全体を用いることができる。この主題についてさらに再検討するには、例えば、Shiraiら、J. Immunol 148:1657-1667、1992年；Choppinら、J. Immunol 147:569-574、1991年；Choppinら、J. Immunol 147:575-583、1991年；Berzofskyら、J. Clin. Invest. 88:876-884、1991年を参照のこと。ここで用いられているように、T細胞エフェクター機能は、成熟T細胞表現型、例えば、細胞毒性、B細胞活性化のためのサイトカイン分泌、及び/又はマクロファージ及び好中球の補充もしくは刺激に関連する。

2. T<sub>H</sub>活性化の測定 ワクチン接種動物から誘導される脾臓細胞培養物を、



組換えタンパク質又はペプチドエпитープのいずれかを添加することによる特異的抗原の記憶復活について、試験する。付随する脾臓抗原提示細胞APCによって提示される、このような抗原によるT細胞の活性化を、これらの培養物の増殖又はサイトカイン産生により監視する。サイトカイン産生のパターンはまた1型又は2型としてのT<sub>H</sub>応答の分類を可能にする。ドメインT<sub>H</sub>2応答は免疫無防備状態の血清陽性患

者における細胞性免疫の排除と相関するに思われるため、患者において所定のPNVによって生じる応答の型を定義することが可能であり、生じる免疫応答の操作を可能にする。

3. 遅延型過敏症 (DTH) i. d. 注射の後のウイルス抗原に対するDT<sub>H</sub>は、細胞性の主としてMHC II制限性の免疫を示すものである。組換えHIVタンパク質及び既知エпитープの合成ペプチドを商業的に入手することが可能性であるため、DT<sub>H</sub>応答はこれらの試薬を用いてワクチン接種された脊椎動物において容易に決定され、したがって、細胞性免疫の誘発についてのさらなるイン・ビボ相関がもたらされる。

#### 防御

上述の免疫学的研究に基づいて、我々のワクチンが脊椎動物において毒性HIVによる攻撃に対して有効であると断言することができる。これらの研究は、これらの動物をPNV構築体、又はgp160<sub>1118</sub>、gag<sub>1118</sub>、nef<sub>1118</sub>及びRE<sub>V</sub><sub>1118</sub>を含むPNV構築体のカクテルで十分にワクチン接種した後に、HIV<sub>1118</sub> /チンパンジーウイルス投与モデルにおいてなされる。このIIIIB株は、この株の致死量のチンパンジー力価が確立されているため、これに関しては有用である。

しかしながら、HIVのあらゆる株及び所定の株に特異的であり、又は非同種エпитープを用いる同じ研究が考えられる。第2のワクチン接種/ウイルス投与モデルは、チンパンジーに加えて、scid-hu PBLマウスである。このモデルは、ヒトリンパ球免疫系、及びマウス宿主におけるHIV投与が続く我々の

ワクチンの試験を可能にする。この系は、あらゆるHIV株での使用に容易に適合し、かつHIVの主要野外単離体の複数の株に対する防御の証拠をもたらすため有利である。第3のウイルス投与モデルはハイブリッドHIV/SIVウイルス(SHIV)を用いる。そのうちの幾つかはアカゲザルに感染し、結果として死に至らしめる免疫不全症に導くことが示されている[L1, J.ら, J. A. D. S. 639-646, 1992年を参照]。アカゲザルに我々のポリヌクレオチドワクチン構築体をワクチン接種することにより、引き続き致死量のSHIV投与に対する防御が生じる。

#### PNV構築体の要約

HIV及び他の遺伝子を、ポリヌクレオチドワクチン接種に対して最適化されている発現ベクターにライゲートする。転写プロモーター、免疫原エピトープ、転写ターミネーター、細菌

複製起点及び抗生物質耐性遺伝子の必須要素を残して、本質的に全ての外来性DNAを除去する。

env及びgagのようなHIV後期遺伝子の発現はrev依存性であり、rev応答要素(RRE)がウイルス遺伝子転写体上に存在することを必要とする。gp120の分泌形態は、revが存在しない状態において、tPA(組織型プラスミノゲン活性化因子)に由来するもののような異種リーダー、好ましくは、高度に発現した哺乳動物タンパク質において見出されるもののようなリーダーペプチド、例えば免疫グロブリンリーダーペプチド、でgp120リーダーペプチドを置換することにより生成させることができる。我々は、形質移入細胞(RD、ヒト横紋筋肉腫系)において分泌gp120を効率的に発現するV1JnsにtPA-gp120キメラ遺伝子を挿入している。モノシストロンgp160は、rev発現ベクターを加えることなしには、形質転換によっていかなるタンパク質をも産生しない。

代表的な構築体成分には以下のものが含まれる(これらに限定されるものではない)

1. tPA-gp120w ;

2. gp160<sub>III</sub> ;

3. gag<sub>III</sub> : 抗-gag CTL用 ;

4. tPA-gp120<sub>III</sub> ;

5. tPA-gp140

6. 構造的な突然変異 : V1、V2、及び/又はV3ループ欠失又は置換を有する tPA-gp160 ;

7. H1V以外の病原体によって発現される抗原、例えば、これらに限定されるものではないか、インフルエンザウイルス核タンパク質、赤血球凝集素、マトリックス、ノイラミニダーゼ、及び他の抗原性タンパク質 ; 単純ヘルペスウイルス遺伝子 ; ヒトパピローマウイルス遺伝子 ; 結核抗原 ; A、B、又はC型肝炎ウイルス抗原をコードする遺伝子。

引き続きウイルス投与に対するポリヌクレオチドH1V免疫系の防御効率は、本発明の非複製プラスミドDNAでの免疫により示される。これは、感染性因子が含まれず、ウイルス粒子の組立を必要とせず、かつ決定基の選択が可能であることから有利である。さらに、gag及びプロテアーゼ及び幾つかの他のウイルス遺伝子産生物の配列がH1Vの様々な株の間に保存されているため、そのクローン化遺伝子が得られた株と同種

であるH1Vの毒性株はもちろん、それは異種の株による引き続きウイルス投与に対する防御が可能である。

gp160をコードするDNA発現ベクターを1. m. 注射することにより、引き続きウイルス投与に対する相当程度の防御免疫が生じる。特に、gp160特異的抗体及び主要CTLが生じる。保存されているタンパク質に対する免疫応答は、可変性エンベロープタンパク質が抗原的シフト及びドリフトするにもかかわらず、有効であり得る。H1V遺伝子産生物の各々がある程度の保存を示し、かつCTLが細胞内発現及びM11C処理に応答して生じるため、多くのウイルス遺伝子がgp160について達成されるものに類似する応答を生じるものと断言できる。このように、発現ベクターにおいてクローン化され、かつ配列決定された接合物によって示されるように、これらの遺伝子の多くが、これらの構築体が

利用可能な形態の免疫原作用因子であるようにクローン化されている。

本発明は、自己複製作用因子又はアジュバントを必要とすることなく交差株防御免疫を誘発するための手段を提供する。加えて、本発明のポリヌクレオチドでの免疫はいくつかの他の利点を提供する。このワクチン接種のアプローチは、C1) B・C

TL応答が感染性作用因子と腫瘍の両方の病態生理学的処理にとって重要である [K. Tanakaら, Annu. Rev. Immunol., 6, 359 (1988年)] ため、この両者に適用可能であるはずである。したがって、形質転換プロセスにとって重要なタンパク質に対する免疫応答の誘発は癌防御又は免疫治療の有効な手段であり得る。ウイルスタンパク質及びヒト成長ホルモンDNAを注射した後に発現するタンパク質に対する高価抗体の産生は、これが、保存された抗原を標的とする細胞毒性Tリンパ球ワクチンとは別に、もしくはそれと組み合わせ、抗体ベースのワクチンを作製する安易かつ非常に有効な手段であることを示唆する。

DNA構築体の産生及び精製の容易さは好都合なことにタンパク質精製の伝統的な方法に匹敵し、したがって、組み合わせワクチンの生成を容易にする。したがって、例えば、gp160、gp120、gp41、又は他のあらゆるHIV遺伝子をコードする複数の構築体を調製し、混合し、かつ同時投与することができる。DNA注射の後にタンパク質の発現が維持されるため、B及びT細胞の記憶の持続が高められ、それにより長期間持続する体液性及び細胞媒介性免疫が生じ得る。

DNA構築体を調製し、かつ精製するための分子生物学の標準技術により、本発明のDNA免疫原の調製が可能となる。したがって、分子生物学の標準技術は本発明の生成物の生成に十分なものはあるが、ここに開示される特定の構築体は、驚くべきことに、これまで標準的な不活性化全ウイルス又はサブユニットタンパク質ワクチンでは達成することができなかった結果である交差株及び主要HIV単離体の中和を生じる新規ポリヌクレオチド免疫原を提供する。

ワクチンレシピエントに導入しようとする発現可能なDNA又は転写されたRNAの量は、用いられる転写及び翻訳プロモーターの強度及び発現する遺伝子産物の免疫原性に依存する。一般には、約1ngないし100mg、好ましくは約10μgないし300μgの免疫学的もしくは予防的有効量が筋肉組織に直接投与される。皮下注射、皮内導入、皮膚を通す圧入、及び他の投与様式、例えば、腹腔内、静脈内、又は吸入送達も期待される。追加ワクチン接種を施すことも期待される。HIVポリヌクレオチド免疫原をワクチン接種した後、gp160、gp120、及びgag遺伝子産物のようなHIVタンパク質免疫原で追加免疫することも考慮される。インターロイキン-

12タンパク質又はGM-CSF又は類似のタンパク質を、単独でもしくは組み合わせ、本発明のPNVの非経口導入と同時にもしくはそれに続いて、非経口投与する、例えば、静脈内、筋肉内、皮下又は他の投与手段で投与することもある利である。

このポリヌクレオチドは裸であってもよく、すなわち、あらゆるタンパク質、アジュバント又はレシピエントの免疫系に衝撃を与える他の作用因子と会合していてもよい。この場合、ポリヌクレオチドは生理学的に許容し得る溶液、例えば、これらに限定されるものではないが、無菌生理食塩水又は無菌緩衝生理食塩水中にあることが望ましい。あるいは、このDNAはリポソーム、例えば、レンチリポソームもしくは当該技術分野において公知の他のリポソームと、DNA-リポソーム混合物として会合していてもよく、又は当該技術分野において免疫応答を高めることが知られるアジュバント、例えば、タンパク質もしくは他の担体と会合していてもよい。細胞のDNA取り込みを補助する作用因子、例えば、これに限られるものではないが、カルシウムイオンも有利に用いることができる。これらの作用因子は、一般にここでは、形質移入促進試薬及び薬学的に許容し得る担体と呼ばれる。ポリヌクレオチドが被覆されて

いる微小弾丸を被覆するための技術は当該技術分野において公知であり、同様に本発明に関連して有用である。

以下の例は説明として提示されるものであり、いかなる方法においても本発明を限定することを意図するものではない。

#### 実施例 1

##### 材料の説明

ベクター pF411 及び pF412: これらのベクターは、R. Gallo の実験室において構築されたベクター pSP62 からサブクローン化した。pSP62 はバイオテック・リサーチ・ラボラトリーズ社 (Bioleech Research Laboratories, Inc.) から入手可能な試薬である。pSP62 は、ラムダ HXB2 からサブクローン化した HXB2 ゲノムの 12.5 kb XbaI 断片を有する。pSP62 を SalI 及び XbaI 消化することにより HXB2 断片: 5' -XbaI/SalI、6.5 kb 及び 3' -SalI/XbaI、6 kb が生じる。これらのインサートを pUC18 の SmaI 及び SalI 部位にサブクローン化することにより pF411 (5' -XbaI/SalI) 及び pF412 (3' -XbaI/SalI) が生じる。pF411 は gag

/pol を含み、pF412 は tat/rev/env/nef を含む。

##### レプリゲン (repigen) 試薬

組換え rev (IIB)、#RP1024-10

組換え gp120 (IIB)、#RP1001-10

抗-rev モノクローナル抗体、#RP1029-10

抗-gp120 mAb、#1c1、#RP1010-10

##### AIDS 研究及び参照試薬プログラム

抗-gp141 mAb ハイブリドーマ、Chessie8、#526

この方策は、細胞毒性 Tリンパ球 (CTL) 並びに HIV、主として HIV gag (~95% 保存) 及び env (gp160 又は gp120: 70-80% 保存) 遺伝子産物に対する中和抗体応答の両者を誘発するように設計されている。抗-env 及び抗-gag CTL 応答の重要性が、これらの細胞性免疫の開始と中和抗体が出現する前に生じる感染後の一次ウイルス血症のクリアランス

とが知られているように併行していることにより、疾患のない状態の維持におけるCTLの役割と同様、強調されるか、gp160はHIV粒子上の既知の中

和抗体エпитープのみを含む。HIVはその遺伝的多様性で名高いため、我々は、高度に保存されたgag遺伝子が広範な交差株CTL応答を生成するはずではあるが、臨床的単離体及びgp41（～90%保存）から誘導される幾つかの代表的なenv遺伝子を含めることにより、より幅の広い中和抗体が得られることを期待している。

#### 実施例2

##### HIV後期遺伝子産物の異種発現

env及びgagのようなHIV構造遺伝子は、完全長タンパク質を生成するために、HIV調節遺伝子revの発現を必要とする。我々は、gagのrev依存性発現が低水準のタンパク質を生じ、revそれ自体が細胞にとって毒性であり得ることを見出している。我々はイン・ビトロでgp160の比較的高水準のrev依存性発現を達成したけれども、このワクチンはrev/gp160 DNAでのイン・ビボ免疫化の後のgp160に対する低水準の抗体しか誘発しなかった。これは、revの既知細胞毒性効果に加えて、数百の核を有する筋小管においてrev機能を得ることの増加した困難性（gag又はenvタンパク質の発現が生じるには、revタンパク質

がrev依存性転写体と同じ核内にあることが必要である）の結果生じるものと思われる。しかしながら、env遺伝子の選択された改変によりrev非依存性発現を得ることが可能である。これらのプラスミドのワクチンとしての利用は評価中である。

一般に、我々のワクチンは、CMV最初期（IE）プロモーター、BGHポリアデニル化部位、及びpUC主鎖を含んでなる我々の一般化されたワクチン接種ベクターVJ1ns内での発現を最適化するため、主としてHIV（IIIB）env及びgag遺伝子を用いている。いかに大きな遺伝子セグメントが用いられるかに依存して（例えば、gp120対gp160）rev依存性発現の効率

を変化させることは、envについて、その本来の分泌リーダーペプチドを組織特異的プラスミノーゲン活性化因子(tPA)遺伝子のもと置換し、CMVイントロンAを有するCMVIEプロモーターの後ろの得られたキメラ遺伝子を発現させることにより達成することができる。tPA-gp120がこの方式で構築された分泌gp120ベクターの例であり、これはワクチン接種マウス及びサルにおいて抗-gp120免疫応答を誘発するのに十分作用する。

膜固定化タンパク質が、分泌されたタンパク質に比較してより多量の(及び、おそらくは、HIV中和に対してより特異的な)抗体応答を誘発し得、また追加の免疫エпитープを提供するという報告のため、V1Jns-tPA-gp160及びV1Jns-rev/gp160を調製した。tPA-gp160ベクターは、発現の水準はrev/gp160、rev依存性gp160発現プラスミドで得られるものよりも非常に低いものの、形質移入細胞の免疫プロット分析によって示されるように、revを添加することなく、検出可能な量のgp160及びgp120を産生した。これは、おそらく、gp160転写体にrev依存性を付与する阻害領域(INSと呼ばれる)がgp41のCOOH-末端を含むgp160内の複数の部位にあるためである(gp143構築体方策の模式図については図1を参照)。tPA-gp160のCOOH-末端が切りつめられた形態、tPA-gp143についてベクターを調製した。これは、これらの阻害配列を除去することによりenvの発現水準全体を増大させるために設計された。また、このgp143ベクターは、細胞表面ではなくリソソームへの膜タンパク質の転換を生じることが知られるペプチドモチーフ(例えば、

Ieu-Ieu)を含む細胞内gp41領域も取り除く。したがって、gp143は、完全長gp160と比較してenvタンパク質の発現(rev依存性を低下させることにより)及び細胞表面へのタンパク質の輸送効率の両者を高めることが期待され、DNAワクチン接種の後の抗-gp160抗体をより誘発することができよう。tPA-gp143を、発現のさるなる阻害配列を除去するために、rev応答要素(RRE)配列(350bp)のさるなるサイレント突然変



異により、さらに改変した。この構築体  $gp143/mutRRE$  は、2つの形態、 $gp120/41$  のタンパク分解開裂部位の除去（形態A）又は保持（形態B）のいずれかで調製した。両形態は、ワクチニアにおいて発現した開裂不可能な  $gp160$  を用いるマウスのワクチン接種が開裂可能な形態よりも非常に高い水準の  $gp160$  に対する抗体を誘発したという報告のために調製した。

細胞形質移入体における  $gp160/gp120$  の発現の定量的ELISAを、これらのベクターの相対的発現可能性を決定するために開発した。293細胞のイン・ビトロ形質移入、続いて細胞会合分泌/放出  $gp120$  の定量を行うことにより、以下の結果を得た：（1） $tPA-gp160$  は、細胞内

対細胞表面への輸送で同様の特性を保持しつつ、 $rev/gp160$  よりも5-10倍少ない  $gp120$  を発現した；（2） $tPA-gp143$  は、低水準の細胞会合  $gp143$  で、 $rev/gp160$  よりも3-6倍多く  $gp120$  を分泌し、 $gp160$  の細胞質のテールが、この配列を部分的に欠失させることにより解決することができる、 $gp160$  の細胞内滞留を引き起こすことが確認される；及び（3） $tPA-gp143/mutRRE$  A及びBは、形態Aについてタンパク分解の除去が確認されたものの、親の  $tPA-gp143$  よりも~10倍高いタンパク質の発現水準をもたらした。図4は要点（1）-（3）を支持する代表的なデータを示す。

このように、我々の  $rev$  非依存性発現を増加させる方策は、発現全体の段階的な増加と共に、膜固定化  $gp143$  のリソソームから細胞表面への再方向付けも与える。異なるウイルス株の間に幾つかの抗原性の相違が存在する場合、様々なウイルス単離体から誘導される  $gp120$  配列を、 $NH_2$ -末端（ $tPA$  リーダー）又は  $COOH$ -末端（ $gp41$ ）のいずれかにこれらの改変を含むベクターカセットに挿入することが可能であるはずであることに注意することが重要である。換言すると、

これは、様々な主要ウイルス単離体から誘導される  $gp120$  を挿入することにより容易に改変して臨床的に関連するワクチンを得ることができる遺伝的構築体

である。

これらの発現方法をワクチン用途に関連するウイルスに適用し、我々のアプローチの普適性を確認するため、我々は主要HIV単離体（ノースアメリカンコンセンサスV3ペプチドループ；マクロファージ指向性及び非融合細胞誘発性表現型を含む）から誘導されるtPA-gp120ベクターをも調製した。このベクターは形質移入293細胞でgp120の高い発現／分泌をもたらし、かつマウスにおいて抗-gp120抗体を誘発し、これはそれが機能的形態でクローン化されていたことを示す。主要単離体gp160遺伝子も実験室株から誘導されるgp160と同じ方法での発現に用いる。

### 実施例3

#### II TV-1 envポリヌクレオチドワクチンに対する免疫応答：

gp120 DNAワクチンを接種したミドリザル（AGM）及びアカゲザル（RHM）は2-3回のワクチン接種の後低水準の中和抗体を示し、これは追加ワクチン接種では増加させる

ことができなかった。これらの結果は、オリゴマー-gp160かおそらくはgp120単量体よりも中和抗体の誘発に関連する標的抗原であるというHIVワクチン分野での認識（Moore及びHo, *J. Virol.*, 67巻：863頁（1993年））の増加と共に、gp160ベースのベクター（上記参照）の有効な発現の獲得に焦点を当てる方向に我々を導いている。また、マウス及びAGMに一次単離体誘導tPA-gp120ワクチンをワクチン接種した。これらの動物は500-5000の範囲の抗-V3ペプチド（相同性配列を用いる）逆最終点（reciprocal endpoint）抗体力価を示し、このワクチンの設計が臨床的に関連するウイルス単離体に対して機能的であることを示す。

gp160ベースのワクチン、rev-gp160及びtPA-gp160はマウス及び非ヒト霊長類において一貫して抗体応答を誘発することに失敗し、又は低抗体力価を生じた。tPA-gp143プラスミドを用いた我々の最初の結果は、2回のワクチン接種の後、マウス及びAGMにおいて $>10^3$ の幾何平均力価を生じた。これらのデータは、我々が、発現水準を高めることによりgp1

60 様ワクチンの免疫原性を大きく

改善していることを示す。この構築体を、 $\text{IPA-gp143}/\text{mutRRE}$   
A 及び B ベクターに加えて、抗体応答、特にウイルスの中和について特徴付けを  
続ける。

同様に、 $\text{gp120DNA}$  のワクチン接種は、 $\text{TH-1}$  様サイトカイン分泌プ  
ロフィール（すなわち、 $\text{IL-4}$  をほとんど、もしくは全く伴わない  $\text{g-}$  インタ  
ーフェロン及び  $\text{IL-2}$  産生）を有する試験した全てのリンパ性区画（脾臓、血  
液、鼠径部、腸間膜及び肺骨髄）において強力なヘルパー T 細胞応答を生じた。  
これらのサイトカインは一般に強力な細胞性免疫を促進し、 $\text{HIV}$  血清陽性患者  
の疾患がない状態の維持に関連付けられている。リンパ節は、ウイルスが血液中  
に未だ検出することができないときでさえ、ウイルスの大貯蔵部を有する、 $\text{HIV}$   
複製の主要部位であることが示されている。我々の  $\text{DNA}$  ワクチンで示されて  
いるような、様々なリンパ部位に抗- $\text{HIV}$  免疫応答を誘発することが可能なワ  
クチンは、最初の感染の後のリンパ管のコロニー形成の成功を妨げる手助けをし  
得る。

前に述べられているように、我々は、以下の目的の実現がこのプログラムの成  
功の機会を最大化するのに必須であると考える：（1）雪長類においてより強い  
中和抗体応答を生成するこ

とが可能な  $\text{env}$  ベースのベクター；（2）雪長類において  $\text{CTL}$  及びヘルパー  
エフェクター機能によって特徴付けられる強力な T リンパ球応答を誘発する  $\text{ga}$   
 $\text{g}$  及び  $\text{env}$  ベクター；（3）臨床的に関連する  $\text{HIV-1}$  株に由来する  $\text{env}$   
及び  $\text{ga}$  遺伝子の我々のワクチンにおける使用並びにそれらが誘発する免疫学  
的応答、特に主要単離体の中和の特徴付け；（4）適切に最適化されたワクチン  
を用いる、動物ウイルス投与モデル、例えば、チンパンジー/ $\text{HIV-1}$  ( $\text{IIB}$   
) 又はアカゲザル/ $\text{SHIV}$  における防御の実証；並びに（5）臨床用途に適す  
る免疫応答の持続期間の決定。これらの目的のうちの最初の 3 つについては大き  
な進歩が見られ、 $\text{gp160}$  及び  $\text{ga}$  に対する我々の最近のワクチン接種構築

体がこれらの初期結果を改善するかどうかを決定するための実験が進行中である

#### 実施例4

ワクチン生成のためのベクター

##### A. V1Jneo発現ベクター、配列番号1:

大規模発酵器においてアンピシリンを用いることができない可能性があるため、V1Jを有する細菌の抗生物質選別に用いられるamp<sup>r</sup>を除去する必要がある。SspI及びEam

I105I制限酵素を用いる消化により、V1JのpUC主鎖からのamp<sup>r</sup>を除去した。残りのプラスミドをアガロースゲル電気泳動により精製し、T4DNAポリメラーゼで平滑末端化した後、子ウシ腸アルカリホスファターゼで処理した。トランスポゾン903から誘導され、かつpUC4Kプラスミドに含まれる商業的に入手可能なkan<sup>r</sup>遺伝子をPstI制限酵素を用いて切り出し、アガロースゲル電気泳動により精製して、T4DNAポリメラーゼで平滑末端化した。この断片をV1J主鎖にライゲートし、V1Jneo#1及び3と命名される、kan<sup>r</sup>遺伝子をいずれかの方向に有するプラスミドを誘導した。これらのプラスミドの各々を制限酵素消化分析、接合領域のDNA配列決定により確認し、これらが同様の量のプラスミドをV1Jとして産生することが示された。これらのV1Jneoベクターは、異種遺伝子産生物の発現もV1Jに匹敵するものであった。V1Jにおけるamp<sup>r</sup>と同じ方向にkan<sup>r</sup>遺伝子を含むV1Jneo#3を発現構築体として任意に選択し、以下これをV1Jneoと呼ぶ（配列番号1）。

##### B. V1Jns発現ベクター:

組み込み研究を容易にするため、V1JneoにSfiI部

位を加えた。商業的に入手可能な13塩基対SfiIリンカー（ニュー・イングランド・バイオラプス（New England BioLabs））をこのベクターのBGH配列内のKpnI部位に加えた。V1JneoをKpnIで直線

化し、ゲル精製し、T4 DNAポリメラーゼにより平滑末端化して平滑末端化Sf i l リンカーにライゲートした。制限マッピングによりクローン単離体を選択し、リンカー全体の配列決定により確認した。この新たなベクターをV l J n s と命名した。(S f i l を有する) V l J n s における異種遺伝子の発現は(K p n l を有する) V l J n e o における同じ遺伝子の発現に匹敵するものであった。

C. V l J n s-t P A :

分泌及び/又は膜タンパク質に異種リーダーペプチド配列を付与するため、ヒト組織特異的プラスミノーゲン活性化因子(t P A) リーダーを含むようにV l J n を改変した。2つの合成相補的オリゴマーをアニールした後、B g l l l 消化したV l J n にライゲートした。センス及びアンチセンスオリゴマーは、5' -GATC A C C A T G GAT GCA ATG AAG AGA GG G CTC TGC TGT GTG

CTG CTG CTG TGT GCA GCA GTC TTC GTT  
TCG CCC AGC GA-3' (配列番号2)、及び5' -GAT CT  
C GCT GGG CGA AAC GAA GAC TGC TCC AC  
A CAG CAG CAG CAC ACA GCA GAG CCC TC  
T CTT CAT TGC ATC CAT GGT-3' (配列番号3) であった。センスオリゴマーにおいてコザック配列に下線が付されている。これらのオリゴマーはB g l l l 開裂配列へのライゲートに適合する突出塩基を有する。ライゲートの後、下流B g l l l は引き続きライゲートのために保持しながら、上流B g l l l 部位を破壊した。接合部及びt P A リーダー配列全体をDNA配列決定により確認した。加えて、我々のコンセンサス最適化ベクターV l J n s (= S f i l 部位を有するV l J n e o) と一致させるため、K p n l 部位をT4 DNAポリメラーゼで平滑末端化し、次いでS f i l リンカー(カタログ# 1138、ニュー・イングランド・バイオラプス)と共にライゲートすることにより、S f i l 制限部位をV l J n-t P A のB G H ターミネーター領域内のK p n l 部位に配置した。この改変を、制限消化及びアガロース

ゲル電気泳動により確認した。

#### 実施例 5

1. HIV-env ワクチン構築体：

分泌env誘導抗原 (gp120及びgp140) を産生するワクチン

gp120のようなrev依存性env遺伝子の発現を以下のように行った：  
gp120を、HIVのMN株から、本来のリーダーペプチド配列と共に (V1Jns-gp120)、又は本来のリーダーペプチドを置換する組織プラスミノゲン活性化因子 (tPA) リーダーペプチドと共に融合体として (V1Jns-tPA-gp120)、PCRクローン化した。tPA-gp120の発現はrev非依存性であることが示されている [B. S. Chapmanら, Nuc. Acids Res. 19巻, 3979頁 (1991年) ; gp120遺伝子をrev非依存性にする上で他のリーダー配列が同様の作用をもたらすことに注意すべきである]。これは、上述のベクターを用いて以下のgp120構築体を調製することにより達成された。

#### 実施例 6

120ワクチン構築体：

A. V1Jns-tPA-HIV-gp120：

ペプチドリーダー配列の最初の30個のアミノ酸を除去し、かつV1Jns-tPAにクローン化してアミノ酸残基30の後の残りのgp120配列が続くtPAリーダーペプチドからなるキメラタンパク質の作製を容易にするように設計されたオリゴマーを用いて、HIVMN gp120遺伝子 (メドイムン (Medimmune)) をPCR増幅した。この設計は、rev非依存性gp120発現及びこのプラスミドを有する細胞からの可溶性gp120の分泌を考慮するものである。用いられたセンス及びアンチセンスPCRオリゴマーは、5'-CCCGGATCCTGATCACAGAAAAATTGTGGTCAACAGTTC-3' (配列番号4)、及び5'-CCCAAGGAATCCACCTGTTAGCGCTTTCTCTCTCACCTCTCTC-3' (配列番号5) であった。翻

訳停止コドンに下線が付されている。これらのオリゴマーは、センスオリゴマーのBamH Iの3'側に位置する

Bcl I部位と共に、翻訳オープンリーディングフレームのいずれかの末端にBamH I制限酵素部位を含む。このPCR産物をBcl I、次いでBamH Iで連続的に消化し、Bgl I消化されているVJIns-tPAにライゲートした後、子ウシ固アルカリホスファターゼ処理した。得られたベクターを配列決定してtPAリーダーとgp120コーディング領域との間のインフレーム融合を確認し、gp120の発現及び分泌を形質移入RB細胞の免疫プロット分析により検証した。

#### B. VJIns-tPA-HIVIII-gp120 :

このベクターは、HIVIII株をgp120配列に用いたことを除いて、I. A. に類似する。用いられたセンス及びアンチセンスPCRオリゴマーは、それぞれ：5'-GGT ACA TGA TCA CA GAA AAA T TG TGG GTC ACA GTC-3' (配列番号6)、及び5'-CC A CAT TGA TCA GAT ATC TTA TCT TTT TT C TCT CTG CAC CAC TCT TC-3' (配列番号7)であった。これらのオリゴマーは、インサートのいずれかの末端にBcl I部位をもたすことに加えて、3'末端のBcl I部位のすぐ上流にEco

RVをもたす。5'末端Bcl I部位は、VJIns-tPAのBgl I部位にライゲートしてtPAリーダー配列及びその本来のリーダー配列を伴わないgp120をコードするキメラtPA-gp120遺伝子の作製を可能にする。ライゲーション産物を制限消化及びDNA配列決定により確認した。

#### 実施例7

##### 140ワクチン構築体：

これらの構築体は、本来のリーダーの代わりにtPAリーダーを有するtPA-gp120と同様にPCRにより調製したが、遺伝子を膜貫通ペプチドのNH<sub>2</sub>-末端で直ちに終止することにより分泌抗原を産生するように設計した(計画

されたカルボキシ末端アミノ酸配列=NH<sub>2</sub>-, . . . . TNWLWYIK-C(OH) [配列番号8]。gp120産生構築体とは異なり、gp140構築体はオリゴマー抗原を産生し、かつ2F5モノクローナル抗体によって定義されるELDKWA (配列番号53) のような既知のgp141含有抗体中和エпитープを保持するべきである。

gp120及びgp141の接合部のgp160タンパク分解開裂部位が保持されているか (B) 又は除去されているか (A)

に応じて2つの形態 (A又はB) で、Kienyら (Prot. Eng. 2巻: 219-255頁 (1988年)) によって記述されるように適切なアミノ酸置換により構築体を調製した (野生型配列=NH<sub>2</sub>-, . . . . KAKRRVVQREKR. . . . COOH (配列番号9) 及び突然変異配列=NH<sub>2</sub>-, . . . . KAKQNHHVQNEHQ. . . . COOH (配列番号10)、変異アミノ酸には下線が付されている)。

A. V1Jns-IPAGp140/mu1RRE-A/SRV-1 3' - UTR (H1V-1)11B ベース :

この構築体は、(最適化されたRRE-Aセグメントを含む) ベクター1VBからAvr11/EcoRVセグメントを得るために、以下のセンス及びアンチセンスPCRオリゴマーを用いてPCRにより得た: 5' -CT GAA AGA CCA GCA ACT CCT AGG GAAT TTG GGG TTG CTC TGG-3' (配列番号11)、及び5' -CGC AGG GGA GGT GGT CTA GAT ATC TTA TTA TTT TAT ATA CCA CAG CCA ATT TGT TAT G-3' (配列番号12)。サルレトロウイルス-1 (SRV-1、下記参照)

から誘導される、合成遺伝子セグメントとして調製された3' -UTRを、gp140オープンリーディングフレームのすぐ3' 側に導入されたSrf1制限酵素部位に挿入した。このUTR配列は、H1V-1env及びgagのrev非依存性発現を容易にするものとして前に記述されている。



B. V I J n s - t P A - g p 1 4 0 / m u t R R E - B / S R V - 1 3 ' -  
U T R ( H I V - 1 <sub>III</sub> ベース) :

この構築体は、構築体 I V C を出発物質として用いることにより env タンパク分解開裂部位が保持されていることを除いて、I T A に類似する。

C. V I J n s - t P A - g p 1 4 / o p t 3 0 - A ( H I V - 1 <sub>III</sub> ベース)  
 :

この構築体は、A v r I I 及び S r f I で制限酵素消化し、次いで g p 3 0 に相当するが翻訳に最適のコドンを含んでなる合成 DNA セグメント (下記 g p 3 2 - o p t を参照) をライゲートすることにより、I V B から誘導した。この g p 3 0 - o p t DNA は、g p 3 2 - o p t から、以下のセンス及びアンチセンスオリゴマーを用いる PCR 増幅により得た : それぞれ、5' - C G T A C A C C T A G G C A T C T

G G G C T G C T C T G G - 3' (配列番号 13) 及び 5' - C C A C A T G A T A T C G C C C G G G C T T A T T A T T T G A T G T A C C A C A G C C A G T T G G T G A T G - 3' (配列番号 14)。この DNA セグメントを A v r I I 及び E c o R V 制限酵素で消化し、対応する DNA セグメントを除去するために A v r I I 及び S r f I で消化した V I J n s - t P A - g 1 4 3 / o p t 3 2 - A (I V D) にライゲートした。得られた生成物をライゲーション接合部の DNA 配列決定及び免疫ブロット分析により検証した。

D. V I J n s - t P A - g p 1 4 0 / o p t 3 0 - B ( H I V - 1 <sub>III</sub> ベース)  
]:

この構築体は、env タンパク分解開裂部位が保持されていることを除いて I I C に類似する。

E. V I J n s - t P A - g p 1 4 0 / o p t a 1 1 - A :

この構築体の env 遺伝子は完全に最適コドンを含んでなる。その定常領域 (C1、C5、g p 32) は、可変領域 1-5 に対応する追加合成 DNA セグメントが翻訳に最適のコドンを含んでなる合成 DNA セグメントを用いて挿入されて

いる、IV

B、D、Hに記述されるものである（以下のHIV-I MNVI-V5に基づく例を参照）。

F. Vilns-tPA-gp140/opt-ali-B :

この構築体は、envタンパク分解開裂部位が保持されていることを除いてIIEに類似する。

G. Vilns-tPA-gp140/opt-ali-A (非IIIB株) :

この構築体は、IIIB以外の株に由来するenvアミノ酸配列が可変（VI-V5）領域全体を通しての最適コドン用法の決定に用いられることを除いて、上記IIEに類似する。

H. Vilns-tPA-gp140/opt-ali-B (非IIIB株) :

この構築体は、envタンパク分解開裂部位が保持されていることを除いてIIGに類似する。

実施例8

gp160ワクチン構築体 :

上述のgp160タンパク分解開裂部位に応じて2つの形態（A又はB）で構築体を調製した。

A. Vilns-rev/env :

このベクターは、エクソンIのlatコーディング領域全体がrevオープンリーディングフレームの初めまで欠失していることを除いて、上記D項に記述されるものの変種である。Vilns-gp160IIIB（上記A項を参照）をPstI及びKpnI制限酵素で消化してgp160遺伝子の5'領域を除去した。PCR増幅を用いて、HXB2ゲノムクローンに由来するgp160の第I REVエクソンからKpnI部位までをコードするDNAセグメントを得た。センス及びアンチセンスPCRオリゴマーは、それぞれ、5'-GGT ACA CTG CAG TCA CCG TCC T ATG GCA GGA AG A AGC GGA GAC-3'（配列番号15）及び5'-CCA CAT

CA GGT ACC CCA TAA TAG ACT GTG ACC-  
3' (配列番号16)であった。これらのオリゴマーは、それぞれ、DNA断片  
の5'及び3'末端にPst I及びKpn I制限酵素部位を付与する。得られた  
DNAをPst I及びKpn Iで消化し、アガロース電気泳動ゲルから精製して  
V1Jns-gp160 (Pst I/Kpn I)にライゲートした。得られたプ  
ラスミドを制限酵素消化により検証した。

### B. V1Jns-gp160:

HIV<sub>111b</sub> クローンHXB2から誘導されるHIV<sub>111b</sub> ゲノムの3'末端側半  
分を含むプラスミドpF412から、PCR増幅により、HIV<sub>111b</sub> gp160  
をクローン化した。PCRのセンス及びアンチセンスは、それぞれ、5'-GG  
T ACA TGA TCA ACC ATG AGA GTG AAG GA  
G AAA TAT CAG C-3' (配列番号17)、及び5'-CCA  
CAT TGA TCA GAT ATC CCC ATC TTA TAG  
CAA AAT CCT TTC C-3' (配列番号18)であった。コザッ  
ク配列及び翻訳停止コドンには下線が付されている。これらのオリゴマーは、c  
nv遺伝子の両端の翻訳オープンリーディングフレームの外側にBcl I制限酵  
素部位を付与する。(Bcl I消化部位はBg l I I消化部位とのライゲートに  
適合し、その後、両制限酵素に対する感受性は喪失する。Bcl Iはgp160  
のPCRクローン化のために選択した。これは、この遺伝子がBamHI部位の  
他に内部Bg l I Iを含むためである)。このアンチセンスオリゴマーはまた、  
上述の他のPCR由来の遺伝子のためBcl Iサイトの前にEcoRvを挿

入する。増幅したgp160遺伝子をアガロースゲル精製し、Bcl Iで消化し  
て、Bg l I Iで消化され、かつ子ウシ腸アルカリホスファターゼで処理されて  
いるV1Jnsにライゲートした。このクローン化遺伝子は約2.6kbのサイ  
ズであり、V1Jnsとのgp160の各接合部をDNA配列決定により確認し  
た。

### C. V1Jns-tPA-gp160 (HIV-111b ベース):

コベクターは、本来のリーダー配列を含まない完全長 gp160 を PCR により得たことを除いて、上記実施例 1 (C) に類似する。センスオリゴマーは 1. C. において用いられたものと同じであり、アンチセンスオリゴマーは、5' - CCA CAT TGA TCA GAT ATC CCC ATC TTA TAG CAA AAT CCT TTC C-3' (配列番号 19) であった。これらのオリゴマーは、インサートのいずれかの末端はもちろん、3' 末端の BcII 部位のすぐ上流の EcoRV にも BcII 部位を付与する。5' 末端 BcII 部位は、VJns-tPA の BgIII 部位にライゲートして、tPA リーダー配列及びその本来のリーダー配列を

含まない gp160 をコードするキメラ tPA-gp160 を作製することを可能にする。ライゲーション産物を制限消化及び DNA 配列決定により検証した。

D. VJns-tPA-gp160/opt C1/opt 41-A (HIV-1 III ベース) :

この構築体は HIV に基づくものであり、gp32 ではなく C5 及び gp41 について完全に最適化されたコドンセグメントを有し、tPA リーダーが続く gp120 のアミノ末端で C1 を置換するさらなる最適化コドンセグメント (下記参照) を行する。この新たな C1 セグメントは、接合 C1/143 を合成するために下記 PCR 用オリゴマーを用いる SOE PCR により、残りの gp143 セグメントに接合させた: 5' - CCT GTG TGT GAG TTT A A A C TGC ACT GAT TTG AAG AAT GAT ACT A A T A C-3' (配列番号 20)。得られる gp143 遺伝子は HIV-5 領域を除いて最適のコドンの使用を含み、C1 及び V1 の接合部に配置される、他の HIV 遺伝子に由来する可変領域を挿入するための独自 PmeI 制限酵素部位を有する。

E. VJns-tPA-gp160/opt C1/opt 41-B (HIV II ベース) :

この構築体は、envタンパク分解開裂部位が保持されていることを除いてI I I Dに類似する。

F V I I n s - t P A - g p 1 6 0 / o p t \_ a l l - A (H I V - 1 i n n ベ  
ース) :

この構築体のenv遺伝子は完全に上述の最適コドンを含んでなる。その常領域(C1、C5、gp32)はI I I D、Eに記述されるものであり、これは(全ての完全に最適化されたgp160に用いられる)カセットとして用いられ、これに対して、可変領域V1-V5は最適コドンを含んでなる合成DNAセグメントから誘導される。

G. V I I n s - t P A - g p 1 6 0 / o p t \_ a l l - B :

この構築体は、envタンパク分解開裂部位が保持されていることを除いてI I I Fに類似する。

H. V I I n s - t P A - g p 1 6 0 / o p t \_ a l l - A (非I I I B株) :

この構築体は、I I I B以外の株に由来するenvアミノ酸配列が可変(V1-V5)領域全体にわたる最適コドン用法の

決定に用いられたことを除いて、上記I I I Fに類似する。

I. I I n s - t P A - g p 1 6 0 / o p t \_ a l l - B (非I I I B株) :

この構築体は、envタンパク分解開裂部位が保持されていることを除いて、I I I Hに類似する。

#### 実施例 9

g p 1 4 3 ワクチン構築体 :

これらの構築体は、上述の他のtPA含有構築体と同様に、本来のリーダーの代わりにtpaを用いてPCRにより調製したが、COOH末端化膜結合envを産生するように設計した(計画された細胞内アミノ酸配列=NH<sub>2</sub>-NRVRQGYSP-COOH)。この構築体は、tPA導入が付随するenvの発現の増加と、envの細胞内部分に対応する転写体又はペプチド領域が発現又はタンパク質安定性/細胞表面への輸送に負に衝撃を与え得る可能性を最少化することとを組み合わせる目的で設計した。上述のように、gp160タンパク分解開裂

部位が除去されているか、又は保持されているかに応じて2つの形態(A又はB)で構築体を調製した。g p 1 4 3に対する切り詰めから得られる残留g p 4 1断片をg p 3 2と呼ぶ。

A. V l J n s - t P A - g p 1 4 3 :

この構築体は、以下のセンス及びアンチセンスPCRオリゴマーで、プラスミドp F 4 1 2を用いるPCRにより調製した: 5' - G G T A C A T G A T C A C A G A A A A A T T G T G G T C A C A G T C - 3' (配列番号21)、及び5' - C C A C A T T G A T C A G C C C G G G C T T A G G G T G A A T A G C C C T G C C T C A C T C T G T T C A C - 3' (配列番号22)。得られたDNA断片は、e n vオープンリーディングフレームのすぐ3'側に位置するS r f I部位で消化されたV l J n s - t P A / B g l I Iにクローン化するためのB c l I制限部位をいずれかの末端に含む。構築体を、ライケーション接合部のDNA配列決定及び形質移入細胞の免疫ブロット分析により検証した(図8)。

B. V l J n s - t P A - g p 1 4 3 / m u t R R E - A :

この構築体は、独自M u n I制限酵素部位及び上述の下流S r f I部位を用いるDNAセグメントの切除により、I V Aに基づくものであった。このセグメントはg p 1 2 0 C 5ドメイン及びg p 3 2全体のタンパク質に相当する。g p 1 6 0の

r e v応答性要素(R R E A)の~350bpに対応する、翻訳に最適なコドンを含む合成DNAセグメントを、スプライス重複伸長(S O E)PCRにより残りのg p 3 2セグメントの接合し、これによりこれらの2つの断片の接合部にA v r I I制限酵素部位が創出された(しかしながら、アミノ酸配列に変化はない)。これらのPCR反応は、g p 3 2含有ドメインを生成させるため、それぞれ以下のセンス及びアンチセンスPCRオリゴマーを用いて行った: 5' - C T G A A A G A C C A G C A A C T C C T A G G G A T T G G G T T G C T G T G G - 3' (配列番号23)及び5' - C C A

CAT TGA TCA G CCC GGG C TTA GGG TGA  
 ATA GCC CTG CCT CAC TCT GTT CAC-3' [配  
 列番号24] (これは、I VAに対してアンチセンスオリゴマーとして用いられた)。突然変異RRE (mutRRE-A) セグメントを、以下のセンスオリゴ  
 マー、5' -GGT ACA CAA TTG GAG GAG CGA GT  
 T ATA TAA ATA TAA G-3' (配列番号25) 及びgp32  
 セグメントの作製に用いたアンチセンスオリゴマーを用いるSOE

PCRにより、gp32の野生型配列に接合した。得られた接合DNAセグメントをMun I及びSrf I制限酵素で消化し、親のgp143/Mun I/Srf I消化プラスミドにライゲートした。得られた構築体を、ライゲーション及びSOE PCR接合部のDNA配列決定並びに形質移入細胞の免疫ブロット分析により検証した (図8)。

C. V1Jns-tPA-gp143/mutRRE-B :

この構築体は、mutRRE-Aの代わりにmutRRE-B合成遺伝子セグメントを用いることによりenvタンパク分解開裂部位が保持されていることを除いて、IVBに類似する。

D. V1Jns-tPA-gp143/opt32-A :

この構築体は、Avr II及びSrf I制限酵素消化、次いでgp32に対応するが翻訳に最適なコドンを含んでなる合成DNAセグメント (下記gp32 optを参照) のライゲーションにより、IVBから誘導した。得られた産生物をライゲーション接合部のDNA配列決定及び免疫ブロット分析により検証した。

E. V1Jns-tPA-gp143/opt32-B :

この構築体は、IVCを初期プラスミドとして用いることに

よりenvタンパク分解開裂部位が保持されていることを除いて、TVDに類似する。

F. V1Jns-tPA-gp143/SRV-1 3' -UTR :

この構築体は、シミアンレトロウイルス (SRV-1、下記参照) から誘導された3' -UTRがgp143オープンリーディングフレームのすぐ3' 側に導入されたSrf1制限酵素部位に挿入されたことを除いて、IVAに類似する。このUTR配列は、HIV env及びgagのrev非依存性発現を容易にするものとして前に記述されている。

G. V1Ins-tPA-gp143/optC1/opt32A:

この構築体はIVDに基づくものであり、C5及びgp32について完全に最適化されたコドンセグメントを有し、tPAリーダーに続くgp120のアミノ末端のC1がさらなる最適化コドン配列 (下記参照) で置換されている。この新たなC1セグメントは、接合C1/143セグメントを合成するための以下のPCR用オリゴマーを用いるSOE PCRにより、残りのgp143セグメントに接合した: 5' -CCT GTG

TGT GAG TTT AAA C TGC ACT GAT TTG AA  
G AAT GAT ACT AAT AC-3' (配列番号26)。得られるgp143遺伝子はV1-V5領域を除いて最適のコドンの使用を含み、他のHIV遺伝子に由来する可変領域を挿入するための独自PmeI制限酵素部位がC1及びV1の接合部に配置されている。

H. V1Ins-tPA-gp143/optC1/opt32B:

この構築体は、envタンパク分解開裂部位が保持されていることを除いてIVHに類似する。

I. V1Hns-tPA-gp143/optall-A:

この構築体のenv遺伝子は完全に最適コドンを含んでる。その定常領域 (C1、C5、gp32) は4B、D、Hに記述されるものであり、可変領域V1-V5に対応するさらなる合成DNAセグメントが翻訳に最適なコドンを含んでる合成DNAセグメントを用いて挿入されている。

J. V1Ins-tPA-gp143/optall-B:

この構築体は、envタンパク分解開裂部位が保持されていることを除いてIVJに類似する。



K.  $V11ns-tPA-gp143/opt-all-A$  (非III B株):

この構築体は、III B以外の株に由来するenvアミノ酸配列が可変(V1-V5)領域全体にわたる最適コドン用法の決定に用いられたことを除いて、上記III Gに類似する。

L.  $V11ns-tPA-gp143/opt-all-B$  (非III B株):

この構築体は、III B以外の株に由来するenvアミノ酸配列が可変(V1-V5)領域全体にわたる最適コドン用法の決定に用いられたことを除いて、上記III Gに類似する。

実施例10

$gp143/glyB$  ワクチン構築体:

これらの構築体は、上述の他のtPA含有構築体(tPA-gp120、tPA-gp140、tPA-gp143及びtPA-gp160)と同様に、本来のリーダーの代わりにtPAリーダーを用いてPCRによって調製したが、gp143と同様にCOOH末端化膜結合envを産生するように設計した。しかしながら、gp143/glyB構築体は、6個のアミノ酸が細胞内ペプチドドメインを含むように計画され、最後の4

個がヒトグリコホリンB(glyB)タンパク質のカルボキシル末端のものと同じである点でgp143とは異なる(計画された細胞内アミノ酸配列=NH<sub>2</sub>-NRRLIKA-COOH(配列番号27)、glyB並びにenv及びglyBの両者に共通の“R”に対応する残基には下線が付されている)。この構築体は、envの細胞内部分に対応するあらゆる転写体又はペプチド領域を完全に除去することにより、さらなるenv発現及び細胞表面への定方向ターゲティングを獲得する目的で設計した。このenvの細胞内部分は、この領域を、短細胞質ドメイン(細胞内アミノ酸配列=NH<sub>2</sub>-RRLIKA-COOH)を有する多量に発現するタンパク質(glyB)からのペプチド配列で置換することにより、発現又はタンパク質安定性/細胞表面への輸送に負の衝撃を与え得る。上述のように、gp160タンパク分解開裂部位が除去されているか、又は保持されているかに応じて2つの形態(A又はB)で構築体を調製した。

A. V I J n s - t P A - g p 1 4 3 / o p t 3 2 - A / g l y B :

この構築体は、g p 1 4 3 の細胞内ペプチドドメインを上述

のグリコホリンBのものに置き換えるのに以下のアンチセンスPCRオリゴマーを用いたことを除いてI V Dと同じである：5' - C C A C A T G A T A T C G C C C G G G C T T A T T A G G C C T T G A T C A G C C G G T T C A C A A T G G A C A G C A C A G C - 3' (配列番号28)。

B. V I J n s - t P A - g p 1 4 3 / o p t 3 2 - B / g l y B :

この構築体は、e n v タンパク分解開裂部位が保持されていることを除いてV Aに類似する。

C. V I J n s - t P A - g p 1 4 3 / o p t C 1 / o p t 3 2 - A / g l y B :

この構築体は、g p 1 2 0 の第1定常領域 (C 1) がI V Hと同様に翻訳に最適なコドンで置き換えられていることを除いてV Aと同じである。

D. V I J n s - t P A - g p 1 4 3 / o p t C 1 / o p t 3 2 - B / g l y B

：この構築体は、e n v タンパク分解開裂部位が保持されていることを除いてV Cに類似する。

E. V I J n s - t P A - g p 1 4 3 / o p t a l l - A / g l y B :

この構築体のe n v 遺伝子は完全に上述の最適コドンを含んでなる。

F. V I J n s - t P A - g p 1 4 3 / o p t a l l - B / g l y B :

この構築体は、e n v タンパク分解開裂部位が保持されていることを除いてV Eに類似する。

G. V I J n s - t P A - g p 1 4 3 / o p t a l l - A / g l y B (非I I J B株) :

この構築体は、I I I B以外の株に由来するe n v アミノ酸配列が可変 (V I - V 5) 領域全体にわたる最適コドン用法の決定に用いられたことを除いて、上記I I I Gに類似する。

H. V1Jns-tPA-gp143/opt-alf-B/glyB (非H1B株) :

この構築体は、envタンパク分解開裂部位が保持されていることを除いてVGに類似する。

様々なループの欠失を伴うHIV envワクチン構築体 :

これらの構築体は上に記載される全てのenv形態(gp

120、gp140、gp143、gp160、gp143/glyB)を含み得るが、調製の間にgp120内の様々なループ(例えば、V1、V2、及び/又はV3)が欠失している。これらの改変の目的は、CD4結合部位のような保存された中和エпитオプの露出を遅らせ得るペプチドセグメントを除去することである。例えば、V1/V2欠失を創出してC1及びC2セグメントの接合を生成させるため、PCR反応において以下のオリゴマーが用いられる: 5'-CTG ACC CCC CTG TGT GTG GGG GCT GGC AGT TGT AAC ACC TCA GTC ATT ACA CAG-3' (配列番号29)。

#### 実施例11

env遺伝子の発現を増大させるための合成遺伝子セグメントの設計 :

遺伝子セグメントを、同一の翻訳された配列(注記される場合を除く)を有しつつ"アミノ酸配列データから推定される合成オリゴヌクレオチドプローブ:理論的及び実地的な考慮(Synthetic Oligonucleotide Probes Deduced from Amino Acid

Sequence Data:Theoretical and Practical Considerations)"と題するJ. Molec. Biol. 183巻、1-12頁(1985年)からの研究論文においてR. Latheによって定義される代替コドン用法を伴う配列に変換した。HIV env遺伝子セグメントのrev非依存性発現を増大させるための下記方法論は、哺乳動物細胞におけるこの遺伝子の効率的な発現の公知の可能性が転写体組成物全体の

影響であるという我々の仮説に基づいた。したがって、同じタンパク質配列をコードする代替コドンを用いることにより、revが存在しない状況におけるenv発現に対する束縛を除去することができる。env内でのコドン用法を精査することにより、コドンの高い割合が高度に発現するヒト遺伝子によってはほとんど用いられないことがないもののうちにあることが明らかになった。用いられる特別なコドン置換法は、Lathéらからのデータを用いて、以下のように記述することができる。

1. 適性オープンリーディングフレームについてコドンの配置を同定する。
2. 野生型のコドン、観察されたヒト遺伝子による使用頻

度と比較する（Lathéらの表3を参照）。

3. コドンが最も一般的に用いられるものではない場合には、表5のデータに基づいて、それを高発現に最適なコドンに置き換える。

4. 新たなコドンの第3ヌクレオチド及び第1のものすく3'側に隣接するコドンの第1ヌクレオチドを検査する。新たなコドンの選択により5'-CG-3'対形成が生じている場合には、それを表5に指示される選択に置き換える。

5. この手順を全遺伝子セグメントが置換されるまで繰り返す。

6. 新たな遺伝子配列を、これらのコドン置換によって生じる望ましくない配列（例えば、“ATTTA”配列、イントロンスプライス認識部位の不注意による創出、望ましくない制限酵素部位等）について検査し、これらの配列を除去するコドンで代わりに用いる。

7. 合成遺伝子セグメントを組み立て、発現の改善について試験する。

これらの方法を、完全に発現に最適なコドン用法を含み得る遺伝子を創出する、以下のHIV envの合成遺伝子セグ

メントを創出するために用いた：それぞれ、56/19、73/26、78/28、及び61/25のコドン置換/ヌクレオチド置換の割合が各々のセグメントについて得られている、(i) gp120-cl (opt)；(ii) V1-V5 (opt)；(iii) RRE-A/B (mut又はopt)；及び(iv)

g p 3 0 ( o p t )。これらのセグメントの各々は上に詳細に記述されており、  
以下に記載される実際の配列を有する。

g p 1 2 0 - C 1 ( o p t )

これは、発現に最適なコドン用法を有するように設計された、成熟N-末端からV1の初めまでのg120定常領域1 (C1) 遺伝子である。

```

1  TGATCACAGA GAAGCTGTGG GTGACAGTGT ATTATGGCGT GCCAGTCTGG
51  AAGGAGGCCA CCACCACOCT GTTCTGTGCC TCTGATGCCA AGGCCTATGA
101 CACAGAGGTG CACAATGTGT GGGCCACCCA TGCCGTGTGTG CCCACAGACC
151 CCAACCCCCA GGAGTGTGTG CTGGTGAATG TGACTGAGAA CTTC AACATG
201 TGGAAGAACA ACATGGTGGA GCAGATGCAT GAGGACATCA TCAGCCTGTG
251 GGACCAGAGC CTGAAGCCCT GTGTGAAGCT GACCCCCCTG TGTGTGAGTT
301 TAAAC (SEQ ID:30)

```

MN V1-V5 ( o p t )

これは、発現に最適なコドン用法を有する、IIIV MN V1-V5の誘導タンパク質配列 (1066BP) に対応する遺伝子セグメントである。

1 AGTTTAACT GCACAGACCT GAGGAACACC ACCAACACCA AGAACTCCAC  
 51 AGCCAAACAA AACTCCAAC TCCGAGGGCAC CATCAAGGGG GGGGAGATGA  
 101 AGAACTGCTC CTTCACATC ACCACCTCCA TCAGGGACAA GATGCAGAA  
 151 GAGTATGCCC TGCTGTACAA GCTGGACAT TGTGTCCATTG ACAATGACTC  
 201 CACCTCCTAC ABBCTGATCT CCTGCAACAC CTCGTGTATC ACCCAGGCT  
 251 GCCCCAAAAT CTCCTTTGAG CGCATCCCCA TCCACTACTG TGCCCTGTGT  
 301 GGCTTTGCCA TCCTGAAGTG CAATGACAAG AAGTTCTCTG GCAAGGGCTC  
 351 CTGCAAGAAT GTGTCCACAG TGCAGTGCAC ACATGGCATC AGGCTGTGG  
 401 TGTCCACCCA GCTGCTGCTG AATGGCTCCC TGGCTGAGGA GSAGGTGCTC  
 451 ATCAGGTCCTG AGAATTTCAC AGACAATGCC AAGACCATCA TCGTGCACT  
 501 GAATGAGTCT GTGCAGATCA ACTGCAACCA GGGCAACTAC AACAGGGA  
 551 AGAGGATCCA CATTGGCCCT GGCAGGGGCT TCTACACAC CAAGAACATC  
 601 ATTGCACCCA TCAGGCAAGC CCACTGCAAC ATCTCCAGGG CCAAGTGAA  
 651 TGACCCCTG AGGCAGATTG TGTCCAAGCT GAAGGACAG TTCAAGAACA  
 701 AGACCATTTG GTTCAACCAG TCCTCTGGGG GGGACCTTGA GATTGTGATG  
 751 CACTCCTTCA ACTGTGGGGG GGAGTTCTTC TACTGCAACA CTTCCCCCT  
 801 GTTCAACTCC ACCTGGAATG GCAACAACAC CTGGAACAAC ACCACAGGCT  
 851 CCAACAACAA CATCACCTC CAGTGCAAGA TCAAGCAGAT CATCAACATG  
 901 TGGCAGGAGG TGGGCAAGGC CATGTATGCC CCCCCATTG ABBGCCAGAT  
 951 CAGGTGCTCC TCCAACATCA CAGGCTGCT GCTGACCAAG GATGGGGGA  
 1001 AGGACACAGA CACCACGAC ACCGAAATCT TCAGGCTTGG GGGGGGGGAC  
 1051 ATGAGGGACA ATTGG (SEQ ID:31)

# RRE. Mut (A)

これは、発現に最適なコドン用法を含んだ、HIV-1のrev応答性要素(RRE)に対応するDNAセグメントである。“A”形態は、ボールド体で示されるヌクレオチドを用いることにより、gp120/gp41接合部の既知タンパク分解開裂部位も除去している。

```

1 GACAATTGGA GGAGOGAGTT ATATAAATAT AAGGTGGTGA AGATTGAGCC
51 CCTGGGGGTG GCOCCAAACAA AAGCTCAGAACCACTGGTG CAGAACGAGC
101 ACAGGCCCGT GGGCATTGGG GDOCTGTTTC TGCGCTTTCT GGGGGCTGCT
151 GGCTCCACAA TGGGCGCGCGC TAGCATGACC CTCACCGTGC AAGCTCGCCA
201 GCTGCTGAGT GGCATGCTCC AGCAGCAGAA CAACCTGCTC CGCGCCATCG
251 AAGCCACGCA GCACCTCTCT CAGCTGACTG TGTEGGGGAT CAAACAGCTT
301 CAGGCCCGGG TGCTGGCGGT CGAGCGCTAT CTGAAAGACC AGCAACTCTT
351 AGGC (SEQ ID:32)

```

# R R E. Mut (B)

これは、発現に最適なコドン用法を含んでなる、HIV-1のrev応答性要素(RRE)に対応するDNAセグメントである。“B”形態はgp120/gp41接合部の既知タンパク分解開裂部位を保持する。

```

1 GACAATTGGA GGAGOGAGTT ATATAAATAT AAGGTGGTGA AGATTGAGCC
51 CCTGGGGGTG GCOCCAAACAA AAGCTCAGAGAGAGTGGTG CAGAGAGAGA
101 AGAGAGCCCGT GGGCATTGGG GDOCTGTTTC TGCGCTTTCT GGGGGCTGCT
151 GGCTCCACAA TGGGCGCGCGC TAGCATGACC CTCACCGTGC AAGCTCGCCA
201 GCTGCTGAGT GGCATGCTCC AGCAGCAGAA CAACCTGCTC CGCGCCATCG
251 AAGCCACGCA GCACCTCTCT CAGCTGACTG TGTEGGGGAT CAAACAGCTT
301 CAGGCCCGGG TGCTGGCGGT CGAGCGCTAT CTGAAAGACC AGCAACTCTT
351 AGGC (SEQ ID:33)

```

# gp32 (opt)

これは、発現に最適なコドンを含んでなる、(RREの末端に接して開始する)AvrII部位からgp143の末端までのgp32遺伝子セグメントである。

1 CCTAGSCATCTGGGGCTGCTCTGGCAAGCTGATCTGCA CCACAGCTGT  
 51 GCGCTGGAAT GCGTCTGGT CCAACAAGAG CCTGGAGCAA ATCTGGAACA  
 101 ACATGACCTG GATGGAGTGG GACAGAGAGA TCAACAATA CACCTCCCTG  
 151 ATCCACTGCC TGATTGAGGA GTCCAGAAG CAGCAGGAGA AGAATGAGCA  
 201 GGAGCTGCTG GAGCTGAGCA AGTGGGCTC CCTGTGGAAC TGGTTCAACA  
 251 TCACCAACTG GCTGTGATC ATCAAAATCT TCATCATGAT TGTGGGGGGC  
 301 CTGGTGGGGC TGGGATTGT CTTTGTGTG CTGTCCATTG TGAACCGGGT  
 351 GAGACAGGGC TACTCCCGCT AATAAGCCCG GCGGATATC (SEQ ID:34)

# SRV-1 CTE (A)

これは、シミアンレトロウイルス-1ゲノムに由来する3'-UTRに対応する合成遺伝子セグメントである。このDNAは、rev非依存性発現を増大させるため、以下の方向で、HIV遺伝子の3'-末端に配置される。

SrfI EcoRV  
 5'-**GGCCGGGC GATATC**TA GACGACCTCC CCTGGGAGCT AAGCTGGACA  
 GCGAATGACG GGTAAAGAGT GACATTTT CACTAACCTA AGACAGGAGG  
 GCGCTCAGAG CTACTGCCCTAATCCAAAGAC GCGTAAAGT GATAAAATG  
 TATCACTCAACCTAAGACA GGCGCAGCTT CCGAGGGATT GTGTCTGT  
 TTTATATATA TTJAAAAGGGTGACCTGTCC GGAGCGGTGCTGCGCGGATG  
 ATGTCTTGG **GATATC GGCCGGGC** -3' (SEQ ID:35)  
 EcoRV SrfI

# SRV-1 CTE (B)

この合成遺伝子セグメントは、ATTTA配列の除去に1つのヌクレオチド突然変異(ボールド体で示される)を用いたことを除いて、上に示されるSRV-1 CTE (A)と同一である。この配列は、増加されたmRNAターンオーバーを伴っている。



SrfI      EcoRV  
 5'-GCCC**GGGC** GATATC TA GACCACTCCCTGCGAGCT AAGCTGAGCA  
 GCCAATGACG GGTAAAGAGATGACATTTT CACTAACTA AGACAGGAGG  
 GCGCTCAGAGCTACTGCGCTAATCCAAAGAC GGGTAAAGT GATAAAATG  
 TATCACTCCAACCTAAGACA GCGCGAGCTT CCGAGGGATT TGTGCTCTGT  
 TTTATATATA TTAAAAGGGTGACCTGTCC GAGCGGTGCTGCGCGGATG  
 ATGTCCTTGG GATATC **GCCC GGGC** -3' (SEQ ID:36)  
 EcoRV      SrfI

#### 実施例 11

##### イン・ビトロでの g p 120 ワクチンの発現：

これらの構築体について、形質移入ヒト横紋筋肉腫（RD）細胞において、イン・ビトロ発現を試験した。形質移入 RD 細胞から分泌される t P A - g p 120 を定量することにより、V I J n s - t P A - g p 120 ベクターが分泌 g p 120 を産生することが示された。

##### イン・ビボ g p 120 ワクチン接種：

V I J n s - t P A - g p 120 μ P N V が誘発するクラス II M H C によって制限される T リンパ球 g p 120 特異的抗原反応性

200 μ g の V I J n s - t P A - g p 120 μ を 2 回 ワクチン接種している B a l b / c マウスを犠牲にし、組織換え g p

120 に対するヘルパー T リンパ球の反応性をイン・ビトロ測定するためそれらの脾臓を抽出した。T 細胞増殖検定を、P B M C（末梢血単核細胞）と共に、組織換え g p 120 μ m m（レプリゲン（Repligen）、カタログ # R P 1016-20）を 5 μ g / m l で用いて、4 × 10<sup>5</sup> 細胞 / m l で行った。これらの細胞による<sup>3</sup>H-チミジン取り込みの基礎レベルを、2 μ g / m l の C o n A 刺激を用いて最大増殖を誘発しながら、これらの細胞を培地単独で培養することにより得た。C o n A 誘発反応性は～3 日でピークになり、その時点で培地対照試料と共に収集し、これに対して、抗原処理試料は 5 日目にさらなる培地対照と共に収集した。ワクチン接種マウスの応答性を、未処置の年齢が一致する同系マウスと比較した。C o n A 陽性対照は、予想通り、未処置及び免疫マウスの両

者で非常に高い増殖を示した。非常に強いヘルパーT細胞記憶応答性がgp120処理によりワクチン接種マウスにおいて得られ、これに対して未処置のマウスは応答しなかった（非活性の閾値は $>3-4$ の刺激指数（SI）である；SIは試料cpm/増地cpmの比として算出する）。ワクチン接種マウスについて65及び14のSIが得られ、これは、それぞれ、これらのマウスに

ついで5643及び11,900の抗-gp120ELISA力値に匹敵する。興味深いことに、これら2匹のマウスについて、抗体についてより応答が大きいものはより低い抗体力値を有するものよりもT細胞反応性が非常に低かった。この実験は、分泌されたgp120ペクターがイン・ビボにおいてヘルパーT細胞を効率的に活性化するだけではなく、強力な抗体応答を生成することを示す。加えて、これらの免疫応答の各々を、接種PNVによってコードされるものと比較して異種である抗原を用いて決定した（IIB対MN）。

#### 実施例12

##### gp160ワクチン

分泌されるgp120構築体に加えて、我々は完全長膜結合gp160の発現構築体を調製している。gp120に加えてgp160構築体の理論的根拠は、（1）CTL刺激、及び強力なHIV中和モノクローナル抗体（2F5、上記参照）が指向するgp41を含む中和抗体産生の両者についてより多くのエピソードが入手可能であること；（2）ウイルス産生gp160に関してより未変性のタンパク質構造を得ることが可能であること；及び（3）免疫原性のための膜結合インフルエン

ザIIA構築体の成功 [Ulmerら, Science 259巻:1745-1749頁, 1993年; Montgomery, D. ら, DNA and Cell Biol., 12巻:777-783頁, 1993年] である。gp160は異種リーダーペプチド配列を有しているにもかかわらずrev依存性を保持しており、そのため、revが存在しない状況での発現を増大させるためさらなる構築体を作製した。

実施例 13HIV細胞毒性Tリンパ球の検定:

この項に記述される方法は、ワクチン接種マウスに用いられる検定を説明する。本質的に類似する検定を、各動物の標的細胞として自己B細胞系を確立しなければならないことを除いて、霊長類で用いることができる。これは、ヒトについてはエプスタイン・バーウイルスを用いて、アカゲザルについてはB型ヘルペスウイルスを用いて達成することができる。

末梢血単核細胞(PBMC)を、新たに採取された血液又は脾臓から、白血球から赤血球を分離するのにフィコールヒバーク遠心を用いて誘導する。マウスについては、リンパ節も用いることができる。エフェクターCTLは、PBMCから、I

L-2 (20 U/ml) 及びコンカナバリンA (2 µg/ml) 中で6-12日イン・ビトロ培養することにより、又は特異的抗原を用いることにより、同数の照射抗原提示細胞を用いて調製することができる。特異的抗原は、用いられる動物のMHCハプロタイプのCTL認識のための既知エピトープである合成ペプチド(通常9-15アミノ酸)、又は適切な抗原を発現するように加工されたワクチンウイルス構築体であり得る。標的細胞は同系であっても、CTLのイン・ビトロ刺激について記述される適切な抗原を提示するように処理されているMHCハプロタイプ一致細胞系であってもよい。Balb/cマウスに対しては、P18ペプチド(Arg I l e H i s I l e G l y P r o G l y A r g A l a P h e T y r T h r T h r L y s A s n [配列番号37]、HIV MN株用)を、照射同系脾臓細胞を用いるイン・ビトロでのCTLの再刺激に10 µMの濃度で用いることができ、かつ細胞毒性検定の間の標的細胞の増殖に、1-10 µMで、この検定の前に37℃で約2時間インキュベートすることにより用いることができる。これらのH-2<sup>d</sup>MHCハプロタイプマウスに対しては、ネズミ脾臓細胞脾細胞系P815が良好な標的細胞をもたらす。標的を37℃

で1-2時間インキュベートし(〜5×10<sup>4</sup>細胞について0.2 mCi)、次

いで標的細胞を数回洗浄することにより、抗原増感標的細胞に $\text{Na}^{24}\text{CrO}_4$ を結合させ、これはCTLで殺したときに標的細胞の内部から放出される。CTL集団を標的細胞と、エフェクターの標的に対する様々な比、例えば、100:1、50:1、25:1で混合し、共にペレット化して37℃で4-6時間インキュベートした後に上清を収集し、次いでこれを、ガンマカウンターを用いて放射能の放出について検定する。細胞毒性を、標的細胞からの自発的放出が差し引かれている、(0.2%トリトンX-100処理を用いて得られる)標的細胞から放出され得る総カウントの割合として算出する。

#### 実施例 14

##### HIV特異的抗体の検定:

特異的相換えタンパク質又は合成ペプチドのいずれかを基質抗原として用いて、HIVに対して産生された抗体を検出するようにELISAを設計した。96ウェルマイクロタイタープレートに、4℃で一晩、PBS(リン酸緩衝生理食塩水)中に $2\mu\text{g}/\text{ml}$ の相換え抗原を $50\mu\text{l}$ /ウェル用いて、振動プラットフォーム上で被覆した。抗原は相換えタンパク質(gp

120, rev:レプリゲン社; gp160, gp41:アメリカン・バイオテクノロジー社(American Bio-Technologies, Inc.))又は合成ペプチド(IIIBに由来するウイルス単離体配列に対応するV3ペプチド等:アメリカン・バイオテクノロジー社;モノクローナル抗体2F5のgp41エピトープ)であった。プレートを洗浄バッファ(PBS/0.05%ツイーン20)を用いて4回洗浄した後、室温で1時間、振動させながら $200\mu\text{l}$ /ウェルのブロッキングバッファ(PBS/0.05%ツイーン20中1%のカーネーション(Carnation)ミルク溶液)を添加した。ブレ血清及び免疫血清をブロッキングバッファに所望の希釈範囲で希釈し、ウェル当たり $100\mu\text{l}$ を加えた。プレートを室温で1時間、振動させながらインキュベートした後、洗浄バッファで4回洗浄した。次に、ブロッキングバッファで1:2000に希釈した、セイヨウワサビペルオキシダーゼを結合させた二次抗体(抗-アカゲザルIg、サザン・バイオテクノロジー・アソシエーツ(So

uthern Biotechnology Associates; 抗-マウス及び抗-ウサギ Ig、ジャクソン・イムノ・リサーチ (Jackson Immuno Research)) を  $100 \mu\text{l}$ /ウェルで各試料に添加し、振動させながら室温で1時間インキュベートした。プレートを洗浄バッファで4回洗浄した後、 $100 \text{mM}$ クエン酸バッファ、 $\text{pH} 4.5$  中  $1 \text{mg/ml}$  の o-フェニレンジアミン (o-PD、カルバイオケム (Calbiochem))  $100 \mu\text{l}$ /ウェルを添加することにより発色させた。プレートを、 $450 \text{nm}$  での吸収について、動力学的 (反応の最初の10分) 並びに10及び30分終末点の両方で読み取った (サーモマックス (Thermo-max) マイクロタイターリーダー、モレキュラー・デバイス (Molecular Devices))。

#### 実施例 1.5

##### HIV中和抗体の検定:

ワクチン接種動物から誘導した血清を用いる、HIV単離体のイン・ビトロ中和の検定を以下の通りに行った。試験血清及び免疫前血清を、使用前に、 $56^\circ\text{C}$  で60分間熱不活性化した。滴定した量のHIV-1を試験血清の1:2連続希釈液に添加し、室温で60分間インキュベートした後、96ウェルマイクロタイター中の  $10^5 \text{MT-4}$  ヒトリンパ球に添加した。この

ウイルス/細胞混合物を  $37^\circ\text{C}$  で7日間インキュベートし、培養物をテトラゾリウム染料で染色することによりウイルスが介在する細胞の死滅について検定した。ウイルスの中和は、ウイルスが介在する細胞の死の防止により観察される。

#### 実施例 1.6

##### 臨床的 HIV単離体からの遺伝子の単離:

HIVウイルス遺伝子を、Con A 処理により活性化している感染PBMCからクローン化した。ウイルス遺伝子を得るための好ましい方法は、所望の遺伝子に隣接する特定のオリゴマーを用いる感染細胞ゲノムからのPCR増幅によるものであった。ウイルス遺伝子を得るための第2の方法は、感染細胞の上清からウ

イルスRNAを精製し、この物質から引き続きPCRでcDNAを調製することによるものであった。この方法は、用いられるPCRオリゴマー及び特定の初回刺激オリゴマーではなくcDNAを作製するのに用いられるランダム6量体を除いて、ネズミB7遺伝子のクローン化について上に記述されるものに非常に類似する。

ゲノムDNAを、感染細胞ベレットから、プロテイナーゼK及びSDSをそれぞれ0.1mg/ml及び0.5%の最終濃

度まで添加したSTE用液(10mM NaCl、10mM EDTA、10mM トリス-HCl、pH8.0)中で溶解することにより精製した。この混合物を56℃で一晩インキュベートし、0.5容量のフェノール：クロロホルム：イソアミルアルコール(25:24:1)で抽出した。次いで、最終濃度0.3Mまでの酢酸ナトリウム及び2容量の冷エタノールを添加することにより水相を沈殿させた。溶液からDNAをベレット化した後、そのDNAを0.1×TE用液(1×TE=10mM トリス-HCl、pH8.0、1mM EDTA)に再懸濁させた。この時点で、2UのRNA分解酵素Aと共にSDSを0.1%まで添加し、37℃で30分間インキュベートした。この溶液をフェノール/クロロホルム/イソアミルアルコールで抽出した後、前と同様にエタノールで沈殿させた。DNAを0.1×TEに懸濁させ、その260nmでの紫外吸収を測定することにより定量した。PCRに用いるまで、試料を-20℃で保存した。

パーキン・エルマー・シータス(Perkin-Elmer Cetus)キット及びgpl60用の下記センス及びアンチセンスオリゴマーを用いる手順を用いて、PCRを行った：そ

れぞれ、5'-GA AAG AGC AGA AGA CAG TGG CA  
A TGA-3' (配列番号38)及び5'-GGG CTT TGC TAA  
ATG GGT GGC AAG TGG CCC GGG CATG TG  
G-3' (配列番号39)。これらのオリゴマーは得られるDNA断片の3'-末端にSrfI部位を追加する。PCR誘導セグメントをV1Jns又はV1RW

クチン接種ベクターのいずれかにクローン化し、ライゲーション接合部位に加え  
てV3領域をDNA配列決定により確認した。

#### 実施例17

##### T細胞増殖検定：

PBMCを得、PBMC集団内での増殖によって決定される特異的抗原に対する記憶復活応答について試験する。増殖を、細胞培養物に添加した<sup>3</sup>H-チミジンを用いて、収集前のインキュベーションの最後の18-24時間監視する。細胞収集装置は増殖が生じている場合アイソタイプ含有DNAをフィルター上に留め、これに対して、静止状態の細胞はアイソタイプを取り込まず、これは遊離形態でフィルター上に留まることがない。げっ歯類又は霊長類のいずれかの種について、 $4 \times 10^5$

個の細胞を、96ウェルマイクロタイタープレート内の合計200 $\mu$ lの完全培地(RPMI/10%ウシ胎児血清)に塗布する。バックグランド増殖応答はPBMC及び培地単独で決定し、これに対して、植物性血球凝集素(PHA)又はコンカナバリンA(ConA)のようなレクチンを1-5 $\mu$ g/mlの濃度で用いて非特異的応答を生成させ、陽性対照として機能させる。特異的抗原は既知ペプチドエピトープ、精製タンパク質、又は不活性化ウイルスのいずれからなる。抗原濃度は、ペプチドについては1-10 $\mu$ M、タンパク質については1-10 $\mu$ g/mlの範囲である。レクチン誘発増殖は細胞培養インキュベーションの第3-5日にピークとなり、これに対して、抗原特異的応答は第5-7日にピークとなる。培地のバックグランドを少なくとも3倍上回る放射カウントが得られた場合に特異的増殖が生じ、これは、しばしば、バックグランドに対する割合、又は刺激指数(SI)として得られる。HIV gp160は、gp160/gp120免疫化又はHIV感染個体のT細胞増殖を引き起こすことが知られる幾つかのペプチドを含むことが知られている。これらのうち最も一般的に用いられるものは：T1(LysGlnIleIleAsnMetTr

pGlnGluValGlyLysAlaMetTyrAla [配列番号40]

); T2 (HisGluAspTlelleSerLeuTrpAspGlnSerLeuLys [配列番号41]); 及びTH4 (AspArgValleGluValValGlnGlyAlaTyrArgAlaIleArg [配列番号42])である。これらのペプチドは、抗原感作マウス、非ヒト霊長類、及びヒトに由来するP BMCの増殖を刺激することが示されている。

#### 実施例 18

##### ベクターVIRの調製:

我々の基本的ワクチン接種ベクターの最適化を継続する努力において、我々はVJInsの誘導体を調製し、それをVIRと命名した。このベクターの構築の目的は、最適化された異種遺伝子発現特性の全て及びVJ及びVJInsがもたらす高いプラスミド収率を依然として保持する最小サイズのベクターワクチン、すなわち不必要なDNA配列を含まないもの、を得ることである。我々は、文献からはもちろんのこと実験によっても、(1)大腸菌複製起点を含むpUC主鎖内の領域を細菌からのプラスミド収率に影響を及ぼさず除去することが

可能であり; (2)細菌のターミネーターが代わりに挿入されている場合には、カナマイシンオープンリーディングフレームに続くkan'遺伝子の3'領域が除去可能であり; かつ(3)BGHの3'側半分の~300bpが(BGH要素内の元来のKpnI制限酵素部位に続く)その調節機能に影響を及ぼさず除去することが可能であることを決定した。

それぞれ、CMVintAプロモーター/BHGターミネーター、複製起点、及びカナマイシン耐性を表す3つのDNAセグメントをVJInsから合成するためにPCRを用いることにより、VIRを構築した。各セグメントに独自の制限酵素をPCRオリゴマーを用いて各セグメント末端に追加した: CMVintA/BHGについてはSspI及びXhoI; kan'遺伝子についてはEcoRV及びBamHI; 及びori'についてはBclI及びSalI。これらの酵素部位は、それらが、PCR誘導DNAセグメントの各々の方向性ライゲーション及び各々の部位の引き続く喪失を可能にするため選択された: EcoRV及びSspIはライゲーションに適合する平滑末端化DNAを残し、これに対して



、BamHI及びBclIはSalI及びXhoIと同様の相補的突出を残す。

これらの

セグメントをPCRにより得た後、各セグメントを上に表示される適切な制限酵素で消化し、次いで、3つのDNA全てを含む単一の反応混合物中で共にライゲートした。oriの5'末端は、それがカナマイシン耐性遺伝子に終止情報をもたすことができるように、この領域に通常見出されるT2rho非依存性ターミネーター配列を含むように設計した。ライゲートした産物を、制限酵素消化(>8酵素)はもちろんのことライゲーション接合部のDNA配列決定によっても確認した。DNAプラスミドの収量及びVIR内のウイルス遺伝子を用いる異種発現はVJnsに類似するようと思われる。達成されたベクターサイズの意味の減少は1346bpであった(VJns=4.86kb;VIR=3.52kb)、[本明細書の配列番号43;図11及びWO95/24485号の配列番号100も参照:PCT国際出願PCT/US95//02633号]

VIRの合成に用いられたPCRオリゴマー配列(制限酵素部位には下線が付され、配列に続く括弧内に付定されている):

(1) 5' -GGT ACA AAT ATT GG CTA TTG GCC  
ATT GCA TAC G-3' [Ssp

1]、(配列番号44):

(2) 5' -CCA CAT CTC GAG GAA CCG GGT CA  
A TTC TTC AGC ACC-3' [XhoI]、(配列番号45):

(CMVinitA/BHGセグメント用)

(3) 5' -GGT ACA GAT ATC GGA AAG CCA CG  
T TGT GTC TCA AAA TC-3' [EcoRV]、(配列番号  
46):

(4) 5' -CCA CAT GGA TCC G TAA TGC TCT  
GCC AGT GTT ACA ACC-3' [BamHI]、(配列番号4

7) :

(カナマイシン耐性遺伝子セグメント用)

(5) 5' -GGT ACA TGA TCA CGT AGA AAA GA  
T CAA AGG ATC TTC TTG-3' [Bcl I]、(配列番号  
48) :

(6) 5' -CCA CAT GTC GAC CC GTA AAA AGG  
CCG CGT TGC TGG-3' [Sal I]、(配列番号49) :

(大腸菌複製起点用)

VIRについて、以下のオリゴマーを用いてライゲーション接合部を配列決定した:

5' -GAG CCA ATA TAA ATG TAC-3' (配列番号50) : [CMVinitA/kan<sup>r</sup>接合部]

5' -CAA TAG CAG GCA TGC-3' (配列番号51) : [BGH/ori接合部]

5' -G CAA GCA GCA GAT TAC-3' (配列番号52) : [ori/kan<sup>r</sup>接合部]

#### 実施例19

##### IIIV後期遺伝子産物の異種発現

env及びgagのようなIIIV構造遺伝子は、完全長タンパク質を効率的に産生するため、IIIV調節遺伝子revの発現を必要とする。我々は、gagのrev依存性発現によっては低水準のタンパク質しか生じず、かつrevそれ自体が細胞にとって毒性であり得ることを見出している。我々はイン・ビトロで比較的高い水準のg160のrev依存性発現を達成したが、このワクチンは、rev/gp160 DNAでのイン・ビボ免疫化の後、gp160に対する抗体を低水準でしか誘発しない。これは、revの既知の細胞毒性効果に加えて、数

の核を有する筋小管においてrev機能を得ることの困難性の増加(gag又は

envタンパク質の発現が生じるには、revタンパク質がrev依存性転写体と同じ核内にあることが必要である)の結果生じる可能性がある。しかしながら、env遺伝子の選択された改変を用いてrev依存性発現を得ることが可能である。

#### 1. envのrev非依存性発現：

一般に、我々のワクチンは、CMV最初期(IE)プロモーター、BGH誘導ポリアデニル化及び転写終止配列、並びにpUC主鎖を含んでなる我々の一般化されたワクチン接種ベクターVJns内での発現を最適化するため、主としてHIV(IIIB)env及びgag遺伝子を用いている。いかに大きな遺伝子セグメントが用いられるかに依存して(例えば、gp120対gp160)、rev依存性発現の効率を変化させることは、envについて、その本来の分泌リーダーペプチドを組織特異的プラスミノーゲン活性化因子(tPA)遺伝子のもとと置換し、CMVイントロンAを有するCMVIEプロモーターの後ろの得られたキメラ遺伝子を発現させることにより達成することができる。tPA-gp120がこの方式で構築

された分泌gp120ベクターの例であり、これはワクチン接種マウス及びサルにおいて抗-gp120免疫応答を誘発するのに十分作用する。

膜固定化タンパク質が、分泌されたタンパク質と比較して、より多量の(及び、おそらくは、HIV中和に対してより特異的な)抗体応答を誘発し得、加えてさらなるエビトープを獲得するという報告のため、VJns-tPA-gp160及びVJns-rev/gp160を調製した。tPA-gp160ベクターは、発現の水準はrev/gp160、rev依存性gp160発現プラスミドで得られるものよりも非常に低いものの、形質移入細胞の免疫プロット分析によって示されるように、revを添加することなく、検出可能な量のgp160及びgp120を産生した。これは、おそらく、gp120転写体にrev依存性を付与する阻害領域がgp41のCOOH-末端を含むgp160内の複数の部位に生じるためである。tPA-gp160のCOOH-末端が切りつめられた形態(tPA-gp143)についてベクターを調製した。これは、これら

の阻害配列を除去することにより env の発現水準全体が増大するように設計された。また、この gp143

ペクターは、細胞表面ではなくリソソームへの膜タンパク質の転換を生じることが知られるペプチドモチーフ（例えば、Leu-Leu）を含む細胞内 gp41 領域も取り除く。したがって、gp143は、(rev 依存性を低下させることにより) env タンパク質の発現を増大させ、かつ完全長 gp160 と比較して細胞表面へのタンパク質の輸送効率を高めることが期待され、これらのタンパク質が DNA ワクチン接種の後の anti-gp160 抗体のより高い誘発が予想される。tPA-gp143 を、発現のさらなる阻害配列を除去するための rev 応答性要素 (RRE) 配列 (350bp) のさらなるサイレント突然変異により、さらに改変した。この構築体 gp143/mutRRE は 2 つの形態：gp120/41 のタンパク分解開裂部位の除去 (形態 A) 又は保持 (形態 B) のいずれかで調製した。両形態は、ワクチニアにおいて発現した開裂不可能な gp160 を用いるマウスのワクチン接種が開裂可能な形態よりも非常に高い水準で gp160 に対する抗体を誘発したという文献報告のために調製した。

細胞形質移入体における gp160/gp120 の発現量の定量的 ELISA を、これらのペクターの相対的発現可能性を

決定するために開発した。293細胞のイン・ビトロ形質移入、続いて細胞会合対分泌/放出 gp120 の定量を行うことにより、以下の結果を得た：(1) tPA-gp160 は、細胞内対細胞表面からの放出で同様の特性を保持しつつ、rev/gp160 よりも 5-10 倍少ない gp120 を発現した；(2) tPA-gp143 は、低水準の細胞会合 gp143 で、rev/gp160 よりも 3-6 倍多く gp120 を分泌し、これにより gp160 の細胞質のテールがこの配列を部分的に欠失させることにより解決することができる gp160 の細胞内滞留を引き起こすことが確認される；及び (3) tPA-gp143/mutRRE A 及び B は、形態 A についてタンパク分解処理の除去が確認されたものの、親の tPA-gp143 よりも ~10 倍高いタンパク質の発現水準をもたら

した。

このように、我々の rev 非依存性発現を増加させる方策は、発現水準全体の段階的な増加と共に、膜固定化 gp143 のリソソームから細胞表面への再方向付けをも生じている。これが遺伝的構築体であり、この構築体には、異なるウイルス株の間に幾つかの抗原性の相違が存在する場合、様々な一次ウイルス単離体から誘導される gp120 配列を、NH<sub>2</sub>-末端 (tP

A リーダー) 又は COOH-末端 (gp41) のいずれかにこれらの改変を含むベクターカセット内に挿入することが可能であるはずであることに注意することが重要である。

図2-7は、gp143ベースの構築体、好ましくは tPA-gp143ベースの構築体を含むがこれに限定されるものではない様々な構築体の、HIV感染に対するDNAワクチンとしての使用を支持するデータを示す。図2は、tPA-143 (opt41) が GMT = 10<sup>3</sup> の範囲で抗-gp120抗体応答を誘発することを示す。図3では、gp143ベースの構築体を含む幾つかのDNAワクチンについて抗-gp120抗体の力価が測定され、比較されている。図4は、tPA-gp160構築体と比較した、tPA-gp143及びtPA-143/mutRREの相対的な発現を示す。図5では、tPA-gp143構築体の optA 及び optB 形態の両方について抗-gp120抗体の産生が測定されている。図6は、ネズミのDNAワクチン接種に続く HIV株に対する中和抗体の産生を促進する、tPA-gp143-optA 及び tPA-gp143-optB を含む幾つかのDNAワクチンの能力を示す。図7も、tPA-gp143-optA、tPA-gp

143-optB、tPA-gp143-optA-glyB 及び tPA-gp143-optB-glyB を含む様々なDNAワクチン構築体の HIV 中和データを示す。

## 2. 臨床的単離体から誘導される gp120 の発現:

これらの発現方策をワクチン用途に関連するウイルスに適用し、我々のアプロ

一チの普遍性を確認するため、我々は一次HIV単離体（ノースアメリカンコンセンサスV3ペプチドループ；マクロファージ向性及び非融合細胞誘発性表現型を含む）から誘導されるtPA-gp120ベクターをも調製した。このベクターは形質移入293細胞でgp120の高い発現/分泌をもたらし、かつマウスにおいて抗-gp120抗体を誘発し、したがって、それが機能的形態でクローン化されていたことを示す。主要単離体gp160遺伝子も実験室株から誘導されるgp160と同じ方法での発現に用いられる。

### 3. HIV envポリヌクレオチドワクチンに対する免疫応答

マウスにおいて免疫応答に対するワクチン接種経路の効果：gp160の発現を改善しようとする努力は継続中であるが、我々は免疫応答及びそれらを増強する方法の評価にtPA-gp

120 DNA構築体を用いている。筋肉内（i. m.）及び皮下（i. d.）ワクチン接種経路を、このベクターについて、100、10、及び1  $\mu$ gの用量でマウスにおいて比較した。いずれの経路によるワクチン接種も、3種類全ての用量水準での2-3回のワクチン接種の後に、抗体応答（GMT =  $10^3$ - $10^4$ ）を誘発した。各々の経路は、類似の抗-gp120抗体力値を明確な用量依存性応答を伴って誘発した。しかしながら、我々はi. d. ワクチン接種について、特に最初の接種後のより低い用量で、より大きな応答の可変性を観察した。さらに、抗原特異的イン・ビトロ増殖及びサイトカイン分泌によって測定されるヘルパーT細胞応答は、i. dよりもi. m. ワクチン接種の後に高かった。我々は、このワクチンについては、i. m. と比較して、i. d. ワクチン接種はいかなる利点をもたらさないものと結論づけた。

### 4. マウスにおけるgp120 DNAワクチン媒介ヘルパーT細胞免疫：

gp120 DNAワクチン接種は、T<sub>H</sub>-1様サイトカイン分泌プロファイル（すなわち、IL-4をほとんど、もしくは全く伴わないg-インターフェロン及びIL-2産生）を有す

る試験した全てのリンパ性区画（脾臓、血液、鼠径部、腸間膜及び腸骨節）にお

いて強力なヘルパーT細胞応答を生じた。これらのサイトカインは一般に強力な細胞性免疫を促進し、HIV血清陽性患者の疾患がない状態の維持に関連付けられている。リンパ節は、ウイルスが血液中に未だ検出することができないときでさえ、ウイルスの大貯蔵庫を有する、HIV複製の主要部位であることが示されている。我々のDNAワクチンで示されているような、様々なリンパ部位に抗-HIV免疫応答を誘発することが可能なワクチンは、最初の感染の後のリンパ管のコロニー形成の成功を妨げる手助けをし得る。

#### 5. env DNAワクチン媒介抗体応答：

gp120 DNAワクチンを接種したミドリザル (AGM) 及びアカゲザル (RHM) は2-3回のワクチン接種の後低水準の中和抗体しか示さず、これは追加ワクチン接種では増加させることができなかった。これらの結果は、オリゴマーgp160がおそらくはgp120単量体よりも中和抗体の誘発に関連する標的抗原であるというHIVワクチン分野での認識の増加と共に、gp160ベースのベクター (上記参照) の有効な発現の獲得に焦点を当てることに我々を導いている。また、

マウス及びAGMに主要単離体誘導 (PA-gp120) ワクチンをワクチン接種した。これらの動物は500-5000の範囲の (相同性配列を用いる) 抗-V3ペプチド逆転終点抗体力価を示し、これは、このワクチンの設計が臨牀的に関連するウイルス単離体に対して機能的であることを示す。

gp160ベースのワクチン、rev-gp160及びtPA-gp160はマウス及び非ヒト霊長類において一貫して抗体応答を誘発することに失敗し、又は低い抗体力価しか生じない。tPA-gp143プラスミドを用いた我々の最初の結果は、2回のワクチン接種の後、マウス及びAGMにおいて $>10^3$ の幾何平均力価 (GMT) を生じた。これらのデータは、我々が、発現水準の増加及び細胞表面へのenvのより効率的な細胞内輸送によりgp160様ワクチンの免疫原性を大きく改善していることを示す。この構築体を、tPA-gp143/mutRRE A及びBベクターに加えて、抗体応答、特にウイルスの中和について特徴付け続ける。

#### 6. サルにおける env-DNA ワクチン介在CTL 応答:

我々は、gp120 及び gp160/IRE5/rev-DNA をワクチン接種した RHM の CTL 応答の特徴付けを継続

した。このワクチンを接種された4頭のサルは全て、2回のワクチン接種の後に、有意のMHCクラスI制限CTL活性を示した(エフェクター/標的=20での20-35%の特異的キル活性)。第4のワクチン接種の後、これらの活性は同じ試験条件下で50-60%キル活性に増加し、これは、追加のワクチン接種が応答を大幅に引き上げたことを示す。このCTL活性は最後のワクチン接種の後少なくとも7ヶ月間それらのピーク水準の約50%で持続し、これは、長期間の記憶が確立されていることを示す。

#### 実施例20

##### SIV/HIV (SHIV) キメラ:

候補HIV-1ワクチンの防御効力を試験する上で主な障害は、このウイルスに適切な動物ウイルス投与モデルを欠くことである。HIVに密接に関連するシミアン免疫不全ウイルス(SIV)がアカゲザルに感染してAIDSを引き起こすものの、HIV-1ウイルス単離体に感染し得る唯一の動物種はチンパンジーである。しかしながら、この感染から得られるウイルス血症は低水準で、一過性で、かつ病原性効果(例えば、リンパ球減少症、免疫不全関連日和見感染等)を示さない。近年、

SIV及びHIVゲノムを含んでなるハイブリッドウイルスが開発され、これらはアカゲザルに対しても感染性であり、かつ感染関連AIDSを引き起こし得る。この型のウイルスの例はSHIV-4(IIIB)である(Li, J. of Acquired Immune Deficiency Syndrome, Vol. 5, 639-646 (1992年))。このウイルスは、調節遺伝子tat及びrev、並びに構造遺伝子envを除くSIV(MAC239)ゲノムを含む。候補HIVワクチンの原則的な成分はenvに基づくため、このウイルスは、ヒトの臨床的な目的で開発されたワクチンを動物モデルにおける感染に



に対する防御効力について試験することを可能にする。

#### 実施例 21

##### プラスミドDNA及び組換えタンパク質組み合わせワクチン：

プラスミドDNA HIV env成分及び組換えHIV envタンパク質成分の両者を有するワクチンを、アカゲザルにおいて抗体応答を誘発するそれらの能力について試験した。図9及び図10は、それぞれ、HIV env遺伝子含有DNAワクチン及び（適切なアジュバント中に配合された）組換え

タンパク質をアカゲザルにワクチン接種した後に得られる抗-gp120ELISA抗体及びSHIV-4（IIIB）ウイルス中和抗体力価を示す。これらのサルは、高力値のenv特異的抗体及び中和抗体を産生した。遺伝子及び卵白アルブミンを含まない“ブランク”DNAをワクチン接種した対照サルは検出可能なenv特異的応答をも示さず、これに対して、このワクチンのタンパク質成分のみをワクチン接種したサルはELISAによって検出される低水準の抗原特異的抗体は示したが中和抗体は示さなかった。これらのサルにSHIV-4（IIIB）ウイルス投与した場合、全ての対照及びタンパク質のみのサルは感染し、これに対して、env DNA及びタンパク質の両者が接種されたものは検出可能なSHIVウイルス血症を示さなかった。これらのサルは、現在、可能性のある感染の遅延開始について定期的に試験を行っている。

## 配列表

配列番号：1

配列の長さ：4864

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：両形態

配列の種類：DNA (genomic)

配列

TCGCCGGTTT CCGTGATGAC GGTGAAAACC TCTGACACAT GCAGCTCCCG GAGACGGTCA	50
CAGCTTGCTCT GTAAAGCGGAT GCGCGGAGCA GACAAGCCCG TCAGGCGCGC TCAGCGGGTG	120
TTGCGGGTG TCGGGGCTGG CTAACTATG CGGCATCAGA GCAGATTGTA CTGAGAGTGC	180
ACCATATGCG GTGTGAAATA CCGCACAGAT CGGTAAAGAG AAAATACGCG ATCAGATTGG	240
CTATTGCGCA TTGCATACGT TGTATCCATA TCATAATATG TACATTTATA TTGCGTCATG	300
TCACAATTA CCGCCATGTT GACATTGATT ATTGACTAGT TATTAAATAGT AATCAATTAC	360
GGGGTCATTA GTTCATAGCC CATATATGGA GTTCGCGGTT ACATAACTTA CGGTAAATGG	420
CCCGCCTGGC TGACCGGCCA ACGACCCCGG CCCATTGACC TCANTAATGA CGTATGTTCC	480
CATAGTAACG CCAATAGGGA CTTTCCATTG ACGTCAATGG GTGGAGTATT TACGGTAAAC	540
TGCCCACTTG GCAGTACATC AAGTGATCA TATGCCAAGT ACGCCCCCTA TTGACGTCAA	600
TGACGGTAAA TGGCCCCGCT GGCATTATGC CCAGTACATG ACCTTATGGG ACTTTCCATC	660
TTGGCAGTAC ATCTACGTAT TAGTCATGCG TATTACCATG GTGATCGGCT TTTGGCAGTA	720
CATCAATGGG CGTGATAGC GGTTTGACTC ACGGGGATTT CCAAGCTCCG ACCCCATTGA	780
CGTCAATGGG AGTTTGTTTT GGCACAAAA TCAACGGGAC TTTCCAAAA GTCTTAACAA	840
CTCGCGCCCA TTGACGCAAA TGGGCGTAG GCCTGTACGG TGGGAGGTCT ATATAAGCAG	900
AGCTCGTTTA GTGAACCGTC AGATCGCCTG GAGACGCCAT CCACGCTGTT TTGACCTCCA	960
TAGAAGACAC CGGACCGGAT CCAGCCTCCG CGGCGGGAAA CGGTGCATTG GAACGCGGAT	1020
TCCCGGTGCC AAGAGTGAGC TAAGTACCGC CTATAGATC TATAGGCCCA CCCCCTTGGC	1080
TTCTTATGCA TGCTATACGT TTTTGGGCTT GGGGTCTATA CACCCCGGCT TCCTCATGTT	1140
ATAGGTGATG GTATAGCTTA GCCTATAGGT GTGGGTATT GACCATTATT GACCCTCCC	1200
CTATTGGTGA CGTACTTTC CATPACTAAT CCATPACATG GCTCTTTGCC ACAACTCTCT	1260
TTATTGGCTA TATCCAAAT CACTGTCTTT CAGAGACTGA CACGGACTCT GTATTTTATC	1320
AGGATGGGCT CTCATTATT ATTACAAAT TCACATATAC AACACACCG TCCCGAGTGC	1380
CCGCGATTTT TATTAAACAT AACGTGGAT CTCACGCGA ATCTCGGTA CGTGTCCGG	1440

ACATGGGCTC TTCTCGGTA GCGGCGGAGC TTCTACATCC GAGCCCTGCT CCCATGCCTC	1500
CAGCGACTCA TGGTCGCTCG GCAGCTCCCTT GCTCCTAACA GTGGAGGCCA GACTTAGGCA	1560
CAGCAGGATG CCCACACCA CCAGTGTGCC GCACAAGGCC GTGGCGGTAG GGTATGTGTC	1620
TGAAAATGAG CTCGGGGAGC GGGCTTGCCAC CCGTCACGCA TTGGGAAGAC TTAAGCGAGC	1680
GGCAGAAGAA GATCGAGCCA GCTGAGTTGT TGTGTTCTGA TAAGAGTCAG AGGTAACCTC	1740
CGTTGCGGTG CTGTTAACGG TGGAGGGCAG TGTAGTCTGA CCAGTACTCG TTGCTGCCGC	1800
GCGGCGCACG AGACATAATA GCTGACAGAC TAACAGACTG TTCTTTTCCA TGGGTCTTTT	1860
CTGCGCTCAC CGTCTTAGA TCTGCTGTGC CTTCCTAGTTG CCAGCCATCT GTGTTTGGC	1920
CCTCCCGGCT GCTTTCTTTG ACCCTGGAAG GTGCCACTCC CACTGTCTTT TCCTAATAAA	1980
ATGAGGAAAT TGCATCGCAT TGTCTGAGTA GGTGTCAATC TATTCTGGGG GGTGGGTGG	2040
GGCAGCACAG CAAGGGGAGC GATTGGGAAG ACAATAGCAG GCATGCTGGG GATGCGGTGG	2100
GCTCTATGGG TACCACGGTG CTGAAGAATT GACCCGGTTC CTCCTGGGCC AGAAAGAAGC	2160
AGGCACATCC CCTTCTCTGT GACACACCTT GTCCACGCCC CTGGTTCCTA GTTCCAGCCC	2220
CACCTCATAG ACACCTCATAG CTCAGGAGGG CTCGCCCTTC AATCCACGCC GCTAAAGTAC	2280
TTGGAGCGGT CTCTCCCTCC CTCATCAGCC CACCAAAACCA AACCTAGCCT CCAAGAGTGG	2340
GAAGAAATTA AAGCAAGATA GGTATTAAAG TGCAGAGGGA GAGAAAATGC CTCCAACATG	2400
TGAGGAAGTA ATGAGAGAAA TCATAGAATT TCTTCGGCTT CTTGGCTCAC TGACTCGCTG	2460
CGCTCGGTGC TTGGCTGGG GCGAGCGGTA TCAGCTCACT CAAAGGCGT AATACGGTTA	2520
TCCACAGAAAT CAGGGGATAA CCGAGGAAAG AACATGTGAG CAAAAGGCCA GCAAAAGGCC	2580
AGGAACCGTA AAAAGGCGC GTTGCTGGCG TTITTCCATA GGCTCCGCCC CCGTGACGAG	2640
CATCACAAA ATCGAGGCTC AAGTCAGAGG TGGCGAAACC CGACAGGACT ATAAAGATAC	2700
CAGGCGTTTC CCCCTGGAG CTCCTCTGTG CGCTCTCTGT TTCCGACCTT GCCGCTTACC	2760
GGATACCTGT CCGCTTTCTT CCGTTGGGA AGCGTGGGCG TTCTCTCAATG CTCACGCTGT	2820
AGGTATCTCA GTTCGGTGTG GGTGTTGCG TCCAAGCTGG GCTGTGTGCA CGAACCCCC	2880
GTTCAGCCCG ACCGCTGGCG CTATCCGGT AACTATCGTC TTGAGTCAA CCCGTAAGA	2940
CACGACTTAT CGCCACTGCG AGCAGCCACT GGTACAGGA TTAGCAGAGC GAGGTATGTA	3000

GGCGGTGCTA CAGAGTTCTT GAAGTGGTG CCTAACTACG GCTACACTAG AAGGACAGTA	3060
TTTGGTATCT GCGCTCTGCT GAAGCCAGTT ACCTTCGGAA AAAGAGTTGG TAGCTCTTGA	3120
TCCGSCAAAC AAACCACCGC TGGTAGCGGT GGTTCCTTTG TTTCCAAGCA GCAGATTACG	3180
CGCAGAAAAA AAGGATCTCA AGAAGATCCT TTGATCTTTT CTACGGGGTC TGACGCTCAG	3240
TGGAACGAAA ACTCACTTA AGGGATTTCG GTCATGAGAT TATCAAAAAG GATCTTCACC	3300
TAGATCCTTT TAAATTAAAA ATGAAGTTT AAATCAATCT AAAGTATA TAAGTAAACT	3360
TGGTCTGACA GTTACCAATG CTTAATCAGT GAGGCACCTA TCTCAGCGAT CTGTCTATTT	3420
CGTTCATCCA TAGTTGCGTG ACTCCGGGG GGGGGGGCG TGAGTCTGC CTCGTGAAGA	3480
AGGTGTTGCT GACTCATACC AGGCTGAAT CCGCCCATCA TCCAGCCAGA AAGTCAGGGA	3540
GCCACGGTGG ATGAGAGCTT TGTGTAGGT GGACCAGTTG GTGATTTTGA ACTTTTGCTT	3600
TGCCACGGAA CGGTCTGGGT TGTGGGAAG ATGCGTGATC TGATCCTTCA ACTCAGCAA	3660
AGTTTCGATT ATTCAACAAA CCGCCCGTCC COTCAAGTCA GCGTAATGCT CTGCGAGTGT	3720
TACAACCAAT TAAACCAATC TGATTAGAAA AACTCATCGA GCATCAATG AAACATGCAAT	3780
TTATTCTATAT CAGGATTATC AATACCATAT TTTGAAAAA CGCGTTCTG TAATGAAGGA	3840
GAAAACTCAC CGAGGCAGTT CCATAGGATG GCAAGATCCT GGTATCGGTC TGCGATTCCG	3900
ACTCGTCAA CATCAATACA ACCTATTAAAT TTCCCTCGT CAAAAATAAG GTTATCAAGT	3960
GAGAAATCAC CATGAGTGAC GACTGAATCC GGTGAGAAT GCAAAAGCTT ATGCAATTTCT	4020
TTCCAGACTT GTTCAACAGG CCAGCCATTA CGCTCGTCAT CAAATCACT CGCATCAACC	4080
AAACGTTTAT TCATTGCTGA TTGCCCTGA GCGAGACGAA ATACGCGATC GCTGTTAAAA	4140
GGACAATTAC AAACAGGAAT CGAATGCAAC CCGCGCAGGA ACACTGCCAG CGCATCAACA	4200
ATATTTTAC CTGAATCAGC ATATTCTTCT AATACCTGGA ATGCTGTTTT CCCGGGATC	4260
CGAGTGGTGA GTAAACATGC ATCATCAGGA GTACGGATAA AATGCTTGAT GGTGGGAAGA	4320
GGCATAAATT CCGTCAGCCA GTTTAGTCTG ACCATCTCAT CTGTAAATC ATTGCAACC	4380
CTACCTTTGC CATGTTTCAG AAACAATCTT GCGCATCGG GCTTCCATA CAATCGATAG	4440
ATTGTGCGAC CTGATTGCC GACATTATCG CGAGCCCAT TATACCCATA TAAATCAGCA	4500
TCCATGTTGG AATTAAATCG CGGCTCGAG CAAGACGTTT CCGTGTGAAT ATGGCTCATA	4560

ACACCCCTTG TATTACTGTT TATGTAAGCA GACAGTTTTA TTGTTTCATGA TGATATATTT	4620
TTATCTTGTC CAATGTAACA TCAGAGATTT TGAGACACAA CGTGGCTTTC CCCCCCCCC	4680
CATTATTGAA GCATTATCA GGGTTATTGT CTCATGAGCG GATACATATT TGAATGTATT	4740
TAGAAAAATA AACAAATAGG GGTTCGCGC ACATTTCGCC GAAAAGTCCC ACCTGACGTC	4800
TAAGAAACCA TTATTATCAT GACATTAACC TATAAAAAA GGCSTATCAC GAGGCCCTTT	4860
CGTC	4864

配列番号：2

配列の長さ：78

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸

種類：/desc = “オリゴヌクレオチド”

配列

GATCACCATG GATGCAATGA AGAGAGGGCT CTGCTGTGTG CTGCTGCTGT CTGGAGCAGT	60
CTTCGTTTTG CCCAGCGA	78

配列番号：3

配列の長さ：78

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸

種類：／desc = "オリゴヌクレオチド"

配列

GATCTCGCTG GGCGAACGA AGACTGCTCC ACACAGCAGC AGCACACAGC AGAGCCCTCT 60

CTTCATTGCA TCCATGGT 78

配列番号：4

配列の長さ：39

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸

種類：／desc = "オリゴヌクレオチド"

配列

CCCCGGATCC TGATCAGAGA AAAATTGTGG GTCACAGTC 39

配列番号：5

配列の長さ：48

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸

種類：／desc＝“オリゴヌクレオチド”

配列

CCCCAGGAAT CCACCTGTTA GCGCTTTTCT CTCIGCACCA CTCITCTC

48

配列番号：6

配列の長さ：35

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸

種類：／desc＝“オリゴヌクレオチド”

配列

GGTACATGAT CACAGAAAAA TTGTGGGTCA CAGTC

35

配列番号：7

配列の長さ：47



配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸

種類：／desc＝“オリゴヌクレオチド”

配列

CCACATTGAT CAGATATCTT ATCTTTTTC TCCTGCACC ACTCTTC

47

配列番号：8

配列の長さ：8 アミノ酸

配列の型：アミノ酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列

Thr Asn Trp Leu Trp Tyr Ile Lys

1

5

配列番号：9

配列の長さ：12 アミノ酸

配列の型：アミノ酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列

Lys Ala Lys Arg Arg Val Val Gln Arg Glu Lys Arg  
1 5 10

配列番号：10

配列の長さ：12アミノ酸

配列の型：アミノ酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列

Lys Ala Gln Asn His Val Val Gln Asn Glu His Gln  
1 5 10

配列番号：11

配列の長さ：42

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸

種類：/desc="オリゴヌクレオチド"

配列

CTGAAGACC AGCAACTCCT AGGGAATTG GGTTCCTCT GG

42

配列番号：12

配列の長さ：58

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸

種類：/desc="オリゴヌクレオチド"

配列

CGCAGGGGAG GTGCTCTACA TATCTTATTA TTTATATATAC CACAGCCAAT TTGTTATG

58

配列番号：13

配列の長さ：30

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸

種類：／desc＝“オリゴヌクレオチド”

配列

GGTACACCTA GGCATCTGGG CCGCTCTGG

30

配列番号：14

配列の長さ：54

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸

種類：／desc＝“オリゴヌクレオチド”

配列

CCACATGATA TCGCCCGGCG TTATTATTGG ATGTACCACA GCCAGTTGGT GATG

54

配列番号：15

配列の長さ：43

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸

種類：/desc="オリゴヌクレオチド"

配列

GGTACACTGC AGTCACCGTC CTATGGCAGG AAGAAGCGGA GAC

43

配列番号：16

配列の長さ：32

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸

種類：/desc="オリゴヌクレオチド"

配列

CCACATCAGG TACCCCATAA TAGACTGTGA CC

32

配列番号：17

配列の長さ：40

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸

種類：／desc＝“オリゴヌクレオチド”

配列

GGTACATGAT CAACCATGAG AGTGAAGGAG AAATATCAGC

40

配列番号：18

配列の長さ：43

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸

種類：／desc＝“オリゴヌクレオチド”

配列

CCACATTGAT CAGATATCCC CATCTTATAG CAAAAATCCTT TCC

43

配列番号：19

配列の長さ：43

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸

種類：/desc="オリゴヌクレオチド"

配列

CCACATTGAT CAGATATCCC CATCTTATAG CAAATCCTT TCC

43

配列番号：20

配列の長さ：48

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸

種類：/desc="オリゴヌクレオチド"

配列

CCTGCTGTG AGTTTAACT GCACGATTT GAAGAATGAT ACTAATAC

48

配列番号：21

配列の長さ：35

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸

種類：／desc＝“オリゴヌクレオチド”

配列

GGTACATGAT CACACAAAAA TTGTGGGTCA CAGTC

35

配列番号：22

配列の長さ：53

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸

種類：／desc＝“オリゴヌクレオチド”

配列

CCACATTGAT CAGCCCGGGC TTAGGCTGAA TAGCCCTGCC TCACTCTGTT CAC

53



配列番号：23

配列の長さ：41

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸

種類：／desc＝“オリゴヌクレオチド”

配列

CTGAAGACC AGCAACTCCT AGGGATTGG GGTGCTGTG G

41

配列番号：24

配列の長さ：53

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸

種類：／desc＝“オリゴヌクレオチド”

配列

CCACATTGAT CAGCCCGGCC TTAGGCTGAA TAGCCCTGCC TCACTCTGTT CAC

53

配列番号：25

配列の長さ：37

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸

種類：／desc＝“オリゴヌクレオチド”

配列

GGTACACAAT TGGAGGAGCG AGTTATATAA ATATAAG

37

配列番号：26

配列の長さ：48

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸

種類：／desc＝“オリゴヌクレオチド”

配列

CCTGTGTCGC AGTTTAAACT GCACTGATTT GAAGAATGAT ACTAATAC

48

配列番号：27

配列の長さ：6 アミノ酸

配列の型：アミノ酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列

Asn Arg Leu Ile Lys Ala  
1 5

配列番号：28

配列の長さ：62

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸

種類：/desc = “オリゴヌクレオチド”

配列

CCACATGATA TCGCCCGGCC TTATTAGGCC TTGATCAGCC GGTTCACAAT GGACAGCACA 60  
GC 62

配列番号：29

配列の長さ：54

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸

種類：/desc="オリゴヌクレオチド"

配列

CTGACCCCC TGTGTGTGGG GGCTGGCAGT TGTAAACACCT CAGTCATTAC ACAG

54

配列番号：30

配列の長さ：305

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：DNA (genomic)

配列

TGATCAGAGA GAAGCTGTGG GTGACAGTCT ATTATGGCGT GCCATCTGG AAGGAGGCCA	60
CCACCACCCCT GTTCTGTGCC TCTGATGCCA AGGCTATGA CACAGAGGTG CACAAATGTCT	120
GGGCCACCCA TGCTGTGTGG CCCACAGACC CCAACCCCA GGAGGTGGTG CTGTGCAATG	180
TGACTGAGAA CTTCACATG TGGAGGACA ACATGGTGA GCAGATGCAT GAGGACATCA	240
TACGCTGTGG GGACCGAGGC CTGAAGCCCT GTGTGAAGCT GACCCCCCTG TGTGTGAGTT	300
TAAAC	305

配列番号: 31

配列の長さ: 1065

配列の型: 核酸

鎖の数: 一本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: DNA (genomic)

配列

AGTTTAAACT GCACAGACCT GAGGAACACC ACCAACACCA ACAACTCCAC AGCCACACAC	60
AACCTCAACT CCGAGGGCAC CATCAAGGGG GGGGAGATGA AGAACTGCTC CTTCACATC	120
ACCACCTCCA TCAGGGACAA GATGCAGAAG GAGTATGCCC TGCTGTACAA GCTGACATTT	180
GTGTCCATTG ACAATGACTC CACCTCCTAC AGGCTGATCT CCTGCAACAC CTCGTGTATC	240
ACCCAGGCGT GCGCCAAJAT CTCCTTTGAG CCCATCCCCA TCCACTACTG TGCCCTCGCT	300
GGCTTTGCCA TCCTGAAGTG CAATCACAAG AAGTTCTCTG GCAAGGGCTC CTGCAAGAA	360
GTGTCCACAG TGCACTGCAC ACATGGCATC AGGCTGTGG TGTCACCCA GCTGCTGCTG	420
AATGGCTCCC TGCTGAGGA GGAGGTGGTC ATCAGGTCTG AGAACTTCAC AGACAATGCC	480
AGAGCATCA TCTGTGACCT GAATGAGTCT GTGCAGATCA ACTGCACCAG GCGCAACTAC	540
AACAAGAGGA AGAGGATCCA CATTGGCCCT GGCAGGGCGT TCTACACCAC CAAGAACATC	600
ATTGGCAGCA TCAGGCAGGC CCACTGCAAC ATCTCCAGGG CCAAGTGGA TGACACCTTG	660
AGGCAGATTG TGTCCAAGCT GAAGGAGCAG TTCAAGAACA AGACCATTTG GTTCAACCG	720
TCCTCTGGGG GGGACCCCTG GATTGTGATG CACTCTTCA ACTGTGGGGG GGAGTTCTTC	780
TACTGCAACA CCTCCCCCT GTTCAACTCC ACCTGGAAATG GCAACAACAC CTGGAACAAC	840
ACCACAGGCT CCAACAACAA CATCACCTCC CAGTGCAGA TCAAGCAGAT CATCAACATG	900
TGCCAGAGG TGGGCAAGG CATGTATGCC CCCCCATTG AGGGCCAGAT CAGGTGCTCC	960
TCCAACATCA CAGGCTGTG GCTGACAGG GATGGGGGA AGACACAGA CACCAACGAC	1020
ACCGAAATCT TCAGGCTGG GGGGGGGAC ATGAGGGACA ATTGG	1065

配列番号：32

配列の長さ：354

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：DNA (genomic)

配列

GACAAATTGGA GGAGCGAGTT ATATTAATAT AAGGTGGTGA AGATTGAGCC CCTGGGGGTG	60
GCCCCAACAA AAGCTCAGAA CCACGTGGTG CAGAACGAGC ACCAGGCCGT GGGCATTGGG	120
GCCTGTTTC TGGGCTTTCT GGGGCTGCT GGCCTCCAA TGGGGCGCGC TAGCATGACC	180
CTCACCCTGC AAGCTCGCCA GCTGCTGAGT GGCATCTCTC AGCAGCAGAA CAACCTGCTC	240
CGGCCCATCG AAGCCAGCA GCACCTCCTC CAGCTGACTG TGTGGGGGAT CAAACAGCTT	300
CAGGCCCGGG TGCTGGCCGT CGAGCGCTAT CTGAAAGACC AGCAACTCCT AGGC	354

配列番号：33

配列の長さ：354

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：DNA (genomic)

配列

GACAAATTGGA GGAGCGACTT ATATAAATAT AAGGTGGTGA AGATTGAGCC CCTGGGGGTG	60
GCCCCAACAA AAGCTAAGAG AAGACTGGTG CAGAGAGAGA AGAGAGCCGT GGCATTGGG	120
GCCCTGTTTC TGGGCTTTCT GGGGCTGCTT GCTCCACAA TGGGCCCCGC TAGCATGACC	180
CTCACCGTGC AAGCTCGCCA GCTGCTGAGT GGCATGCTCC AGCAGCAGAA CAACCTGTC	240
CGGGCCATCG AAGCCACGA GCACCTCCTC CAGCTGACTG TGTGGGGGAT CAAACAGCTT	300
CAGGCCCGGG TGCTGGCGGT CGAGCGCTAT CTGAAAGACC AGCAACTCTT AGGC	354

配列番号：34

配列の長さ：387

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：DNA (genomic)

配列

CCTAGGCATC TGGGGCTGCT CTGGCAAGCT GATCTGCACC ACAGCTGTGC CCTGGAATGC	60
CTCTGTGTCC AACAAAGGCC TGGAGCAAT CTGGAACAC ATGACCTGGA TGGAGTGGGA	120
CAGAGAGATC AACAACTACA CCTCCCTGAT CCACTCCCTG ATTGAGGAGT CCCAGAACCA	180
GCAGGAGAGG AATGAGCAGG AGCTGCTGGA GCTGGACAAG TGGGCTCCC TGTGGAAGTG	240
GTTCACATC ACCAACTGGC TGTGGTACAT CAAAATCTTC ATCATGATG TGGGGGGCTT	300
GCTGGGGCTG CGGATTGTCT TTGCTGTGCT GTCCATTGTG AACCGGGTGA GACAGGGCTA	360
CTCCCCCTAA TAAGCCCGGG CGATATC	387

配列番号：35

配列の長さ：269

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：DNA (genomic)

配列

GCCCGGGCGA TATCTAGACC ACCTCCCCTG CGAGCTAAGC TGGACAGCCA ATGACGGGTA	60
AGAGAGTGAC ATTTTTCAC T AACCTAAGAC AGGAGGGCCG TCAGAGCTAC TGCTAATCC	120
AAAGACGGGT AAAAGTGATA AAAATGTATC ACTCCAACCT AAGACAGCGC CAGCTTCCGA	180
GGGATTTCCT GTCTGTTTAA TATATATTTA AAAGGCTGAC CTGTCCGGAG CCGTCTGCC	240
CGGATGATGT CTGGGATAT? CCCCCGGC	269

配列番号：36

配列の長さ：269

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：DNA (genomic)

配列

GCCCGGGCGA TATCTAGACC ACCTCCCCTG CGAGCTAAGC TGGACAGCCA ATGACGGGTA	60
AGAGAGTGAC ATTTTTCAC T AACCTAAGAC AGGAGGGCCG TCAGAGCTAC TGCTAATCC	120
AAAGACGGGT AAAAGTGATA AAAATGTATC ACTCCAACCT AAGACAGCGC CAGCTTCCGA	180
GGGATTTCCT GTCTGTTTAA TATATATTTA AAAGGCTGAC CTGTCCGGAG CCGTCTGCC	240
CGGATGATGT CTGGGATAT? CCCCCGGC	269



配列番号：37

配列の長さ：15アミノ酸

配列の型：アミノ酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列

Arg	Ile	His	Ile	Gly	Pro	Gly	Arg	Ala	Phe	Tyr	Thr	Thr	Lys	Asn
1				5					10				15	

配列番号：38

配列の長さ：26

配列の型：核酸

鎖の数：両形態

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸

種類：/desc = “オリゴヌクレオチド”

配列

GAAAGAGCAG AAGACAGTGG CAATGA

配列番号：39

配列の長さ：40

配列の型：核酸

鎖の数：両形態

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸

種類：/desc="オリゴヌクレオチド"

配列

GGCCTTGTCT AAATGGGTGG CAAGTGCCCC GGGCATGTGG

40

配列番号：40

配列の長さ：16アミノ酸

配列の型：アミノ酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列

Lys Gln Ile Ile Asn Met Trp Gln Glu Val Gly Lys Ala Met Tyr Ala  
1 5 10 15

配列番号：41

配列の長さ：13アミノ酸

配列の型：アミノ酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列

His Glu Asp Ile Ile Ser Leu Trp Asp Gln Ser Leu Lys  
1 5 10

配列番号：42

配列の長さ：15アミノ酸

配列の型：アミノ酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列

Asp Arg Val Ile Glu Val Val Gln Gly Ala Tyr Arg Ala Ile Arg  
1 5 10 15

配列番号: 43

配列の長さ: 3547

配列の型: 核酸

鎖の数: 二本鎖

トポロジー: 両形態

配列の種類: cDNA

配列

GATATTGGCT ATTGGCCATT GCATACGTTG TATCCATATC ATAAATATGTA CATTATATAT	60
GGCTCATGTC CAACATTACC GCCATGTTGA CATTGATTAT TGACTAGTTA TTAATAGTAA	120
TCAATTACGG GGTCAITAGT TCATAGCCCA TATATGAGAGT TCCGCGTTAC ATAACITACG	180
GTAAATGGCC CGCTGGCTG ACCGCCCAAC GACCCCGGCC CATTGACGTC AATAATGACG	240
TATGTTCCCA TAGTAACGCC AATAGGGACT TTCATATGAC GTCAATGGGT GGAGTATTTA	300
CGGTAAACTG CCCACTTGGC AGTACATCAA GTGTATCATA TGCCAAGTAC GCCCCCTATT	360
GACGTCAATG ACGGTAAATG GCCCGCCTGG CATTATGCCC AGTACATGAC CTTATGGGAC	420
TTTCCTACTT GGCAGTACAT CTACGTATTA GTCATCCCTA TTACCATGGT GATCGGGTTT	480

TGGCAGTACA	TCAATGGGCG	TGGATAGCGG	TTTGACTCAC	GGGGATTTC	AAGTCTCCAC	540
CCCATTGACG	TCAATGGGAG	TTTGTTTTGG	CACCAAAATC	AACGGGACTT	TCCAAAATGT	600
CGTAACAACT	CGGCCCCATT	GACGCAAAATG	GGCGGTAGGC	GTGTACGGTG	GGAGGTCTAT	660
ATAAGCAGAG	CTCGTTTAGT	GAACCGTACG	ATCGCCCTGG	GAGGCCATCC	ACGCTGTTTT	720
GACCTCCATA	GAAGACACCG	GGACCGATCC	AGCCTCGGCG	GCCGGGAACG	GTGCATTGGA	780
ACGCGGATTC	CCCGTGCCAA	GAATGACGTA	AGTACCCGCT	ATAGAGTCTA	TAGGCCCAACC	840
CCCTTGGCTT	CTTATGCATG	CTATACTGTT	TTTGGCTTGG	GGTCTATACA	CCCCCGCTTC	900
CTCATGTAT	AGGTGATGGT	ATAGCTTAGC	CTATAGGTGT	GGGTATTGGA	CCATTATTGA	960
CCACTCCCCT	ATTGGTGACG	ATACTTTCCA	TTACTAATCC	ATAACATGGC	TCCTTGGCCAC	1020
AACCTCTCTT	ATTGGCTATA	TGCCAATACA	CTGTCCCTCA	GAGACTGACA	CGGACTCTGT	1080
ATTTTACAG	GATGGGTCT	CATTTATTAT	TTACAAATTC	ACATATACAA	CACCACCGTC	1140
CCCACTGCC	GCAGTTTTTA	TTAAACATAA	CGTGGGATCT	CCACGGGAAT	CTCGGTACG	1200
TGTTCCGAC	ATCGGCTCTT	CTCCGGTAGC	GGCGGAGCTT	CTACATCCGA	GCCTGTCTCC	1260
CATGCTCCA	GGACTCATG	GTGCTCGGC	AGCTCCTGCG	TCCTAACAGT	GGAGGCCAGA	1320
CTTAGGCACA	GCACGATGCC	CACCAACACC	AGTGTGCGCG	ACAAGCCGCT	GGGGTAGGG	1380
TATGTGCTG	AAAATGAGCT	CGGGGAGCGG	GCTTGCAACG	CTGACGCATT	TGGAAGACTT	1440
AAGGCAGCG	CAGAAGAAGA	TCCAGCCAGC	TGAGTTGTTG	TGTTCTGATA	AGAGTCAGAG	1500
GTAACTCCCG	TTGCGGTGCT	GTTAACGGTG	GAGGGCAGTG	TAGTCTGAGC	AGTACTCGTT	1560
GCTGCCGCG	GCGCCACCAG	ACATAATAGC	TGACAGACTA	ACAGACTGTT	CTTTTCCATG	1620
GGTCTTTTCT	GCAGTCACCG	TCCTTAGATC	TGCTGTGCTT	TCTAGTGGCC	AGCCACTCTGT	1680
TGTTTGCCCC	TCCCCCGTGC	CTTCTTGAC	CCTGGAAGGT	GCCACTCCCA	CTGTCTTTTC	1740
CTAATAAAAT	GAGGAAATTG	CATCGCATTG	TCTGAGTAGG	TGTCATTCTA	TTCTGGGGGG	1800
TGGGTGGGG	CAGCACAGCA	AGGGGGAGGA	TTGGGAGAGC	AATAGCAGGC	ATGCTGGGGA	1860
TGCGGTGGCG	TCTATGGGTA	CGGCCGCAGC	GGCCGTACCC	AGGTGCTGAA	GAATTGACCC	1920

GGTTCCTCGA	CCCCAAAAA	GGCCGGGTTG	CTGGCCTTTT	TCATAGGCT	CGGCCCCCT	1980
GACGAGCATC	ACAAAAATCG	ACGCTCAAGT	CAGAGGTGGC	GAAACCCGAC	AGGACTATAA	2040
AGATACCAGG	CGTTTCCCCC	TGGAAGCTCC	CTCGTGGCT	CTCCTGTTCC	GACCCCTGCCG	2100
CTTACCGGAT	ACCTGTCCGC	CTTCTCCCT	TGGGAAGCG	TGGCGCTTC	TCAATGCTCA	2160
CGCTGTAGGT	ATCTCAGTTC	GGTGTAGGT	GTTCCGCTCA	AGCTGGGCTG	TGTGCACGAA	2220
CCCCCGTTT	AGCCCGACCG	CTGGCCCTTA	TCCGGTAACT	ATCGTCTTGA	GTCCAACCCG	2280
GTAAGACAG	ACTTATCGCC	ACTGGCAGCA	GCCACTGGTA	ACAGGATTAG	CAGAGCGAGG	2340
TATGTAGGCG	GTGCTACAGA	GTTCTTGAAG	TGCTGGCTA	ACTACGGCTA	CACTAGAAGG	2400
ACAGTATTTG	GTATCTGGCG	TCTGCTGAAG	CCAGTTACCT	TCGGAAAAAG	AGTTGGTAGC	2460
TCTTGATCCG	GCAAAACAAAC	CACCGCTGGT	AGCGGTGGTT	TTTGTGTTG	CAAGCAGCAG	2520
ATTACGCGCA	GAAAAAAGG	ATCTCAGAA	GATCCTTTGA	TCTTTTCTAC	GTGATCCCGT	2580
AATGCTCTGC	CAGTGTTACA	ACCAATTAAC	CAATCTGTAT	TAGAAAAACT	CATCGAGCAT	2640
CAAAATGAAA	TGCAATTTAT	TCATATCAGG	ATTATCAATA	CCATATTTT	GAAAAAGCCG	2700
TTTCTGTAA	GAAAGAGAAA	ACTCACCGAG	CAGGTTCCAT	AGGATGGCAA	GATCCTGGTA	2760
TGGGTCTGG	ATTCGACTC	GTCCAACATC	AATACAACCT	ATTAAATTCC	CCTCGTCAA	2820
AATAAGGTTA	TCAGCTGAGA	AATCACCATG	AGTCACGACT	GAATCCGGTG	AGAATGGCAA	2880
AAGCTTATGC	ATTCTTTTCC	AGACTTGTTC	AACAGGCCAG	CCATTACGCT	CGTCATCAAA	2940
ATCACTCGCA	TCAACCAAAC	CGTTATTTCAT	TGCTGATTGC	GCCTGAGCGA	GACGAAATAC	3000
GCGATCGCTG	TTAAAAAGGAC	AATTACAAAC	AGGAATCGAA	TGCAACCGCG	GCAGGAACAC	3060
TGCCAGCGCA	TCAACAATAT	TTTCACTGA	ATCAGGATAT	TCTTCTAATA	CCTGGAATGC	3120
TGTTTTCCCG	GGGATCGCAG	TGGTAGTAA	CCATGCATCA	TCAGGAGTAC	GGATAAAATG	3180
CTTGATGGTC	GGAAGAGGCA	TAAATTCCGT	CAGCCAGTTT	AGTCTGACCA	TCTCATCTGT	3240
AACATCATTG	GCAACGCTAC	CTTTGCCATG	TTTCAGAAAC	AACTCTGGCG	CATCGGGCTT	3300
CCCATACAA	CGATAGATTG	TGCAACCTGA	TTGCCCGACA	TTATCGCGAG	CCCATTTATA	3360
CCCATATAAA	TCAGCATCCA	TGTTGGAATT	TAAATCGGCG	CTCGAGCAAG	ACCTTTCCCG	3420

TTGAATATGG CTCATAACAC CCCTTCFATT ACTGTTTATG TAACGAGACA GTTTTATTGT	3480
TCATGATGAT ATATTTTAT CTGTGCAAT GTAACATCAG AGATTTTGAG ACACAACGTG	3540
GCTTTCC	3547

配列番号：44

配列の長さ：33

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸

種類：/desc="オリゴヌクレオチド"

配列

GGTACAAATA TTGGCTATTG GCCATTGCAT ACG

33

配列番号：45

配列の長さ：36

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸

種類：／desc = “オリゴヌクレオチド”

配列

CCACATCTCG AGGAACGGG TCAATCTCC AGCACC

36

配列番号：46

配列の長さ：38

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸

種類：／desc = “オリゴヌクレオチド”

配列

GGTACAGATA TCGGAAGCC ACGTTCTGTC TCAAAATC

38

配列番号：47

配列の長さ：37

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状



配列の種類：他の核酸

種類：／desc = “オリゴヌクレオチド”

配列

CCACATGGAT CCGTAATGCT CTGCCAGTGT TACAACC

37

配列番号：48

配列の長さ：39

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸

種類：／desc = “オリゴヌクレオチド”

配列

GGTACATGAT CACGTAGAAA AGATCAAAGG ATCTTCTTC

39

配列番号：49

配列の長さ：35

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸

種類：/desc="オリゴヌクレオチド"

配列

CCACATGTCG ACCCGTAAAA AGCCCGGTT GCTGG

35

配列番号：50

配列の長さ：18

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸

種類：/desc="オリゴヌクレオチド"

配列

GAGCCAATAT AAATGTAC

18

配列番号：51

配列の長さ：15

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸

種類：／desc＝“オリゴヌクレオチド”

配列

CAATAGCAGG CATGC

15

配列番号：52

配列の長さ：16

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸

種類：／desc＝“オリゴヌクレオチド”

配列

GCAAGCAGCA GATTAC

16

配列番号：53

配列の長さ：6 アミノ酸

配列の型：アミノ酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列

Glu Leu Asp Lys Trp Ala  
1 5

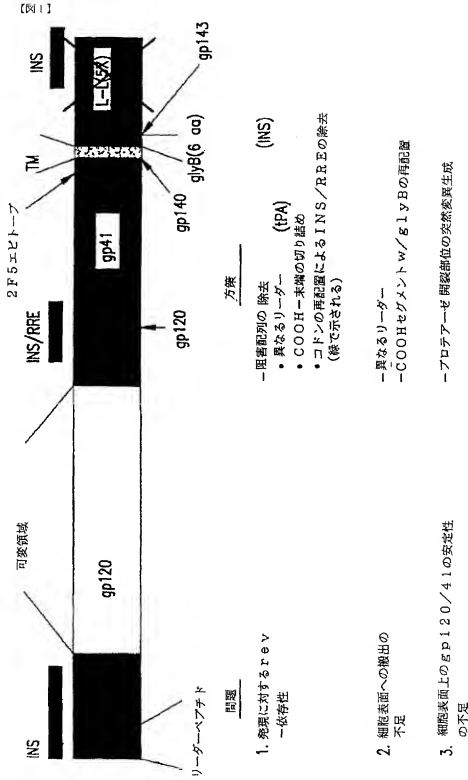


FIG.1

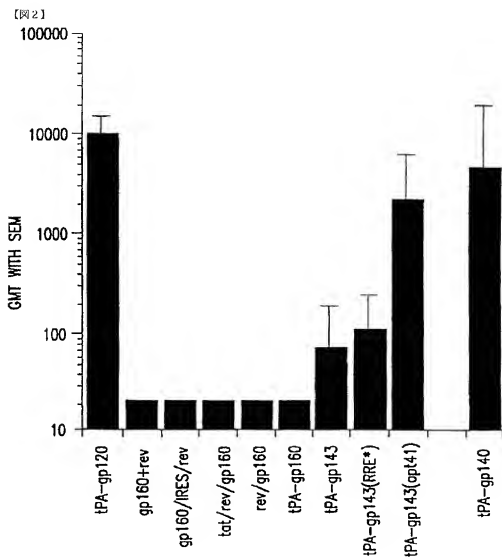


FIG.2

【図3】

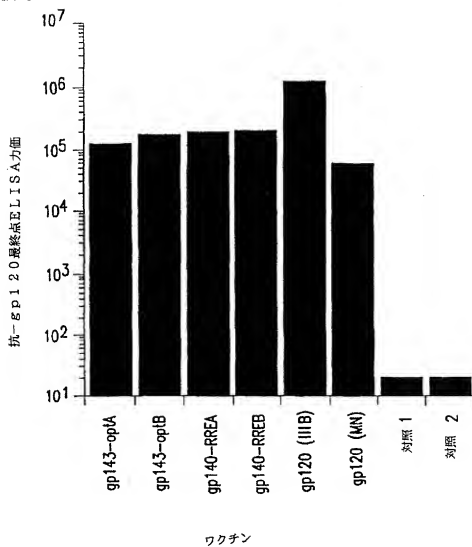


FIG.3

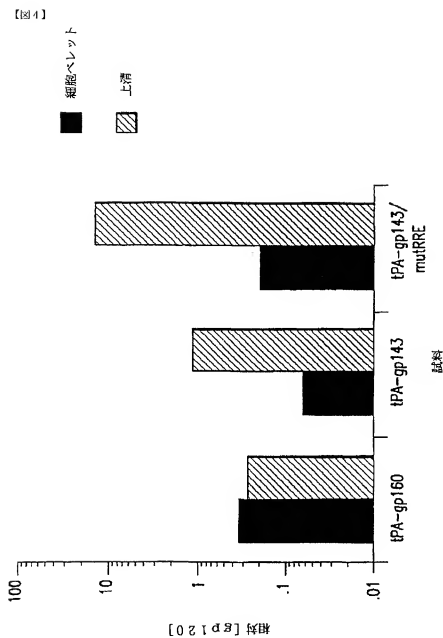


FIG.4



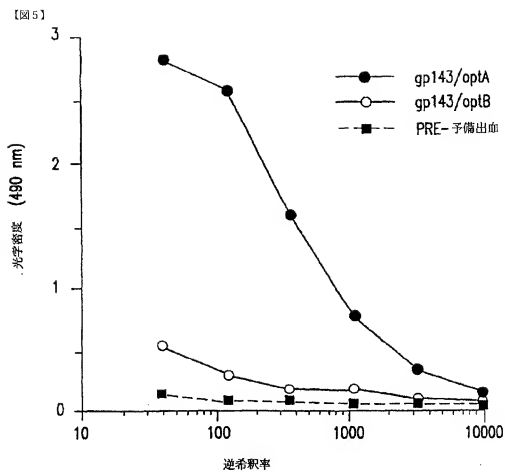


FIG.5

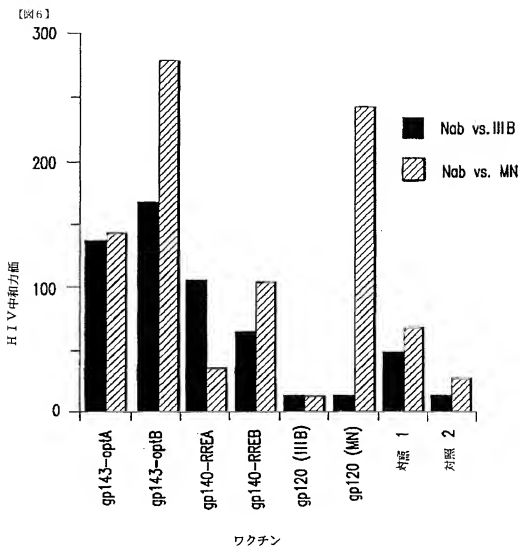


FIG.6

【図7】

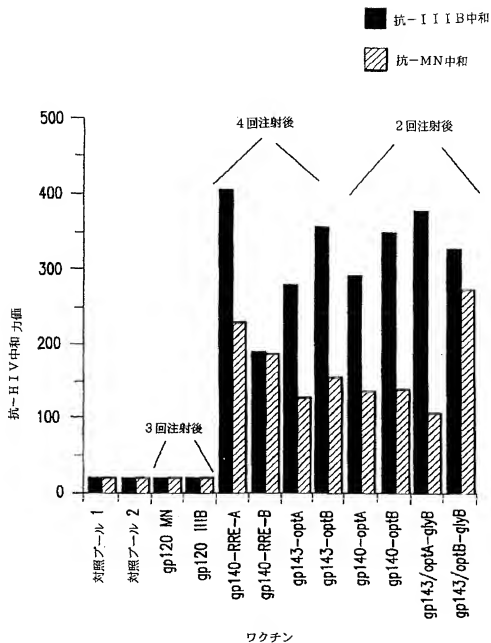


FIG.7

【例8】

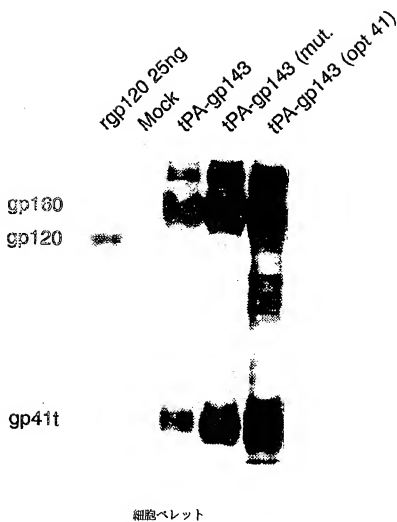


FIG.8

【図9】

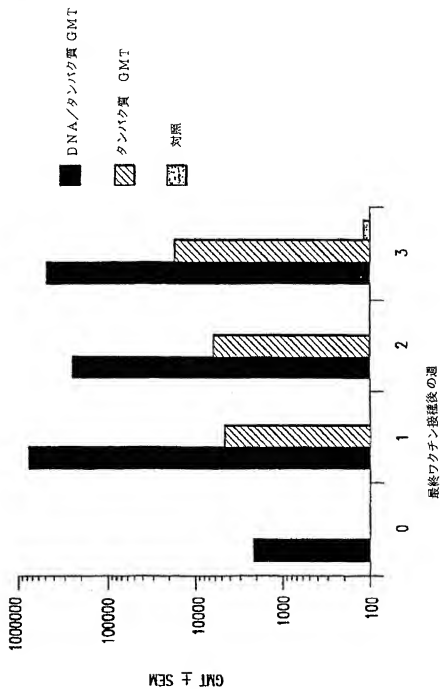


FIG.9

【図10】

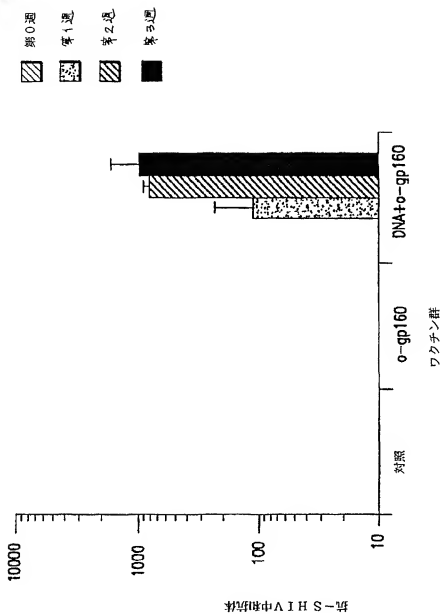


FIG.10

[国際調査報告]

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.  
PCT/US 97/10517A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
IPC 6 C12N15/49 A61K48/00 A51K31/70 C12N15/67

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS RESEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
IPC 6 C12N .A61K C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 95 20660 A (UNIVERSITY OF MASSACHUSETTS MEDICAL CENTER) 3 August 1995 see page 45, line 16 - page 62, line 10 ---	1-13, 15-18
X	K. OKUDA ET AL.: "Induction of potent humoral and cell-mediated immune responses following direct injection of DNA encoding the HIV type 1 env and rev gene products" AIDS RESEARCH AND HUMAN RETROVIRUSES, vol. 11, no. 8, August 1995, pages 933-943, XP062036839 see the whole document ---	1-13, 15-18
	-/--	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

## \* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another disclosure or other special reason (as specified)
- "O" document relating to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "I" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but used to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is considered with one or more other such documents, each contribution being additive to a person skilled in the art
- "L" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search:

5 December 1997

Date of mailing of the international search report

2 0, 01 98

Name and mailing address of the ISA  
European Patent Office, P.O. Box 5518 Patenthaus 2  
61-5200 JVI Rijswijk  
Tel: (+31-70) 3402040, Telex 31 851 upost,  
Fax: (+31-70) 3402012

Authorized officer:

Cupido, M

Form PCT/ISA210 (second sheet) (July 1992)

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.  
PCT/US 97/10517

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	B. WANG ET AL.: "Gene inoculation generates immune responses against human immunodeficiency virus type 1" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, vol. 90, 1 May 1993, WASHINGTON US, pages 4156-4160, XP060688482 see the whole document ---	1-13, 15-18
X	WO 94 16737 A (D.B. WEINER ET AL.) 4 August 1994 see page 59, line 26 - page 89, line 22 ---	1-13, 15-18
P,X	WO 96 21356 A (VANDERBILT UNIVERSITY) 18 July 1996 see the whole document ---	1-13, 15-18
P,X	WO 97 11086 A (THE GENERAL HOSPITAL CORPORATION) 27 March 1997 see page 16, line 19 - page 17, line 15 ---	1-3,5,19
P,X	DATABASE WPI Section Ch, Week 9641 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class B04, AN 96-498330 XP092036840 & JP 08 198 774 A (OKUDA K) , 6 August 1996 see abstract ---	1-13, 15-18
E	WO 97 31115 A (MERCK & CO., INC.) 28 August 1997 see the whole document -----	1-18



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No.

PCT/US 97/10517

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9520660 A	03-08-95	CA 2181832 A	03-08-95
		EP 0740704 A	05-11-96
		JP 9508622 T	02-09-97
		US 5620896 A	15-04-97
WO 9416737 A	04-08-94	US 5593972 A	14-01-97
		AU 675702 B	13-02-97
		AU 6232094 A	15-08-94
		EP 0681483 A	15-11-95
		HU 73899 A	28-06-96
		JP 8509694 T	15-10-96
		ZA 9400493 A	03-01-95
WO 9621356 A	18-07-96	AU 2958795 A	31-07-96
WO 9711086 A	27-03-97	NONE	
WO 9731115 A	28-08-97	AU 2124697 A	10-09-97

## フロントページの続き

(51) Int. Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	マークコード (参考)
C I 2 N 5/06		C I 2 N 5/00	E
5/10			B
C I 2 P 21/02		A 6 I K 37/02	
(31) 優先権主張番号	9 6 1 4 9 4 2 . 2		
(32) 優先日	平成 8 年 7 月 16 日 (1996. 7. 16)		
(33) 優先権主張国	イギリス (GB)		
(31) 優先権主張番号	9 6 1 4 9 4 3 . 0		
(32) 優先日	平成 8 年 7 月 16 日 (1996. 7. 16)		
(33) 優先権主張国	イギリス (GB)		
(81) 指定国	EP (A T, B E, C H, D E, D K, E S, F I, F R, G B, G R, I E, I T, I U, M C, N L, P T, S E), OA (B F, B J, C F, C G, C I, C M, G A, G N, M L, M R, N E, S N, T D, T G), AP (G H, K E, L S, M W, S D, S Z, U G, Z W), EA (A M, A Z, B Y, K G, K Z, M D, R U, T J, T M), A L, A M, A U, A Z, B A, B B, B G, B R, B Y, C A, C N, C U, C Z, E E, G E, H U, I L, I S, J P, K G, K R, K Z, L C, L K, L R, L T, L V, M D, M G, M K, M N, M X, N O, N Z, P L, R O, R U, S G, S I, S K, S L, T J, T M, T R, T T, U A, U S, U Z, V N, Y U		
(72) 発明者	ダビース、メリー・エレン アメリカ合衆国、ニュー・ジャージー・ 07065、ローウエイ、イースト・リンカー ン・アベニュー・126		
(72) 発明者	フリード、ダニエル・シー アメリカ合衆国、ニュー・ジャージー・ 07065、ローウエイ、イースト・リンカー ン・アベニュー・126		
(72) 発明者	リウ、マーガレット・エー アメリカ合衆国、ニュー・ジャージー・ 07065、ローウエイ、イースト・リンカー ン・アベニュー・126		
(72) 発明者	ベリー、ヘレン・シー アメリカ合衆国、ニュー・ジャージー・ 07065、ローウエイ、イースト・リンカー ン・アベニュー・126		